

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

**“ESTRÉS OXIDANTE EN CÉLULAS DEL MÚSCULO LISO AISLADAS DE
AORTA DE ANIMALES CON SÍNDROME METABÓLICO: EFECTO DE LA
LEPTINA”**

T E S I S

Que para obtener el grado de Maestra en Biología Experimental

P R E S E N T A

BIÓLOGA EXPERIMENTAL OCAROL LÓPEZ ACOSTA

Comité Tutorial:

➤ Dra. Norma Edith López Díaz Guerrero
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

➤ Dr. Mohammed El-Hafidi Bentlakder
Departamento de Biomedicina Cardiovascular
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

➤ Dra. Angélica Ruiz Ramírez
Departamento de Biomedicina Cardiovascular
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

MEXICO, D.F.

JUNIO/2015

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 284105


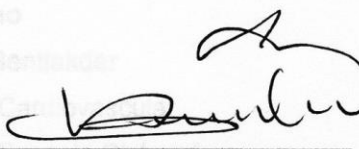
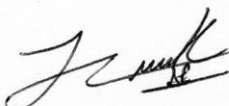
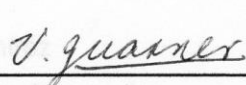
Este trabajo fue apoyado parcialmente por el proyecto No. 106845 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT); Responsable técnico: Dr. Mohammed El Hafidi Bentlakder.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

“Estrés oxidante en células del músculo liso aisladas de aorta de animales con síndrome metabólico: efecto de la leptina”, que presentó
Ocarol López Acosta

El día 5 de junio del año 2015

Sinodales:

 _____ Presidente Dra. Mina Konisberg Fainstein Departamento Ciencias de la Salud Universidad Autónoma Metropolitana	 _____ Secretario Dra. Karla G. Carvajal Aguilera Departamento Nutrición Experimental Instituto Nacional de Pediatría
 _____ Vocal 1 Dr. Julio C. Almanza Pérez Departamento Ciencias de la Salud Universidad Autónoma Metropolitana	 _____ Vocal 2 Dra. Verónica Guarnier Lans Departamento Fisiología Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado de Biología Experimental de la UAM-Iztapalapa

Al CONACyT por apoyar parcialmente el proyecto No. 106845

Al Departamento de Nutrición Experimental del Instituto Nacional de Pediatría por permitirnos usar el microscopio marca Olympus Fluoview 1.7

Con formato: Izquierda

AGRADECIMIENTOS

A mi comité tutorial integrado por el Dr. Mohammed El Hafidi Bentlyakder, la Dra. Norma Edith López Díaz Guerrero y la Dra. Angélica Ruiz Ramírez, gracias por su tiempo, consejos y por compartir sus conocimientos.

A la Dra. Mina Konisberg Fainstein, a la Dra. Karla Guadalupe Carvajal Aguilera, al Dr. Julio Cesar Almanza Pérez y a la Dra. Verónica Guarner Lans, gracias por sus observaciones.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Biomedicina Cardiovascular del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

DEDICATORIAS

A mis padres Abel López y Victoria Acosta por sus consejos, cariño y por motivarme a seguir preparándome profesionalmente.

A mis tíos Urbano López y Bertha Carballo y a mis primas Fanny, Yasmin y Jaque por su cariño y apoyo incondicional.

A Juan mi esposo por tú amor y apoyo.

A mi hijo Diego Mateo por la alegría que trajiste a mi vida, por el amor, cariño y por ser mi motivación más grande.

A Angélica gracias por tus consejos, por brindarme tú amistad, apoyarme incondicionalmente y compartir tus conocimientos.

A Dora Molina por tu amistad, consejos y apoyo.

A Israel, Esther, Miguel, Adán y Eli por su amistad y apoyo.

Al Dr. Vicente, gracias por su apoyo.

Al Dr. Mohammed por darme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto, por su paciencia, tiempo y por compartir sus conocimientos.

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	5
2. RESUMEN.....	8
3. SUMMARY.....	10
4. INTRODUCCIÓN.....	12
5. ANTECEDENTES.....	14
5.1. Síndrome Metabólico.....	14
5.1.1. Definición según la Organización Mundial de la Salud (OMS).....	14
5.1.2. Definición según el Programa Nacional de Educación sobre Colesterol en el Panel III para el Tratamiento del Adulto.....	15
5.1.3. Definición según la Federación Internacional de Diabetes.....	15
5.2. Estrés oxidante	16
5.2.1. Sistema antioxidante.....	17
5.2.2. Estrés oxidante y SM	19
5.2.2.1. Estrés oxidante: efecto de los AGL	20
5.2.3.2. Estrés oxidante: efecto de la LEP.....	21
5.2.3. Fuentes de ERO en el tejido vascular.....	23
5.2.3.1 NADPH oxidasa.....	23
5.2.3.2 La mitocondria como fuente de ERO.....	24
5.3. CMLV y su papel en la fisiopatología vascular.....	26
5.4. RI y enfermedades cardiovasculares.....	27
5.4.1. Vía de señalización de la insulina.....	29

5.4.2. Otras acciones de la insulina.....	31
6. JUSTIFICACIÓN.....	34
7. HIPÓTESIS.....	35
8. OBJETIVO GENERAL.....	35
9. OBJETIVOS PARTICULARES.....	35
10. MATERIAL Y MÉTODOS.....	36
10.1. Antecedentes generales del modelo.....	36
10.2. Modelo experimental de SM.....	37
10.3. Análisis de AGL, TG, glucosa, insulina y LEP.....	37
10.4. Cultivo primario de CMLV.....	38
10.5. Tratamiento de las CMLV para la determinación de IR β , IRS1 y Akt.....	39
10.6. Obtención de proteína.....	39
10.7. Cuantificación de proteína por Bradford.....	39
10.8. Electroforesis y Western blot	40
10.9. Obtención de proteína para evaluar la actividad enzimática de catalasa y SOD.....	41
10.10. Determinación de la actividad de la enzima catalasa.....	41
10.11. Determinación de la actividad de la enzima SOD.....	42
10.12. Cuantificación de ERO a nivel celular por microscopia confocal.....	43

10.13. Efecto del DPI, NAC y Tempol sobre la generación de ERO en CMLV.....	43
10.14. Análisis de imágenes.....	43
10.15. Análisis estadístico.....	44
11. RESULTADOS.....	45
11.1. Características generales de los animales.....	45
11.2. Generación de ERO en CMLV.....	46
11.2.1. Efecto del AP sobre la generación de ERO en CMLV.....	47
11.2.2. Efecto de la LEP sobre la generación de ERO en CMLV.....	49
11.2.3. Efecto del AP+LEP sobre la generación de ERO en CMLV.....	50
11.3. Efecto del DPI, NAC y Tempol sobre la generación de ERO en CMLV.....	51
11.3.1. Efecto del DPI, NAC y Tempol sobre CMLV tratadas con AP.....	52
11.3.2. Efecto del DPI, NAC y Tempol sobre CMLV tratadas con LEP.....	53
11.3.3. Efecto del DPI, NAC y Tempol sobre CMLV tratadas con AP+LEP.....	54
11.4. Enzimas antioxidantes.....	55
11.5. Análisis de la Nox.....	61
11.5.1. Análisis de la subunidad p22 de la Nox.....	61
11.5.2. Análisis de la subunidad p47 de la Nox.....	62

11.6. Proteínas de la vía de señalización de la insulina.....	63
12. DISCUSIÓN.....	67
12.1. Características generales de los animales.....	67
12.2. Generación de ERO en CMLV.....	68
12.3. Proteínas de la vía de la insulina.....	72
13. CONCLUSIONES.....	75
14. PERSPECTIVAS.....	75
15. REFERENCIAS.....	76

1. Abreviaturas y símbolos

AGL	Ácidos grasos libres
Ang II	Angiotensina II
AP	Ácido Palmítico
Apo E	Apoproteína E
ASB	Albúmina de Suero Bovino
CD36	Translocasa de ácidos grasos
CMLV	Células del músculo liso vascular
CRP	Proteína C reactiva
CTE	Cadena Transportadora de Electrones
Cu/Zn SOD	Superóxido Dismutasa de Cobre/Zinc
DCF	Diacetato 2',7'diclorodihidrofluoresceína
DM₂	Diabetes Mellitus Tipo 2
DPI	Cloruro de difenileniodonium
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
GLUT4	Transportador de glucosa 4
GMPc	Guanosín Monofosfato Cíclico
GPx	Glutación peroxidasa
GSK3	Glucógeno sintasa cinasa 3
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HTA	Hipertensión arterial
IDF	Federación Internacional de Diabetes

IGF	Factor de crecimiento homólogo de insulina
IGFR1	Receptor del factor de crecimiento homólogo de insulina 1
IMC	Índice de Masa Corporal
IR	Receptor de Insulina
IRS	Sustrato del Receptor de Insulina
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LHS	Lipasa Hormono Sensible
LEP	Leptina
LO₂H	Hidroperóxidos Lipídicos
MAPK	Proteína cinasa activada por mitogenos
mNADH	Nicotinamida adenina dinucleótido mitocondrial
Mn/SOD	Superóxido Dismutasa de Manganeso
MPC1	Transportador de piruvato mitocondrial 1
NAC	N-acetilcisteína
NCEP: ATPIII	Programa nacional de educación sobre colesterol en el panel III para el tratamiento del adulto
NOS	Óxido nítrico sintasa
O₂^{•-}	Anión superóxido
OH[•]	Radical hidroxilo
ON[•]	Óxido nítrico
ONOO⁻	Peroxinitrito
OMS	Organización Mundial de la Salud

PA	Presión Arterial
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno 1
PDK-1	Proteína dependiente de fosfoinosítidos
PIP₃	Fosfatidil inositol 3, 4, 5 trifosfato
PI3-K	Fosfatidil inositol 3 cinasa
PKC	Proteína cinasa C
PPARγ	Receptor activado por el proliferador peroxisomal gama
RI	Resistencia a la insulina
SFB	Suero Fetal de Bovino
SM	Síndrome Metabólico
Tempol	4 Hidroxi-Tempo
TG	Triglicéridos
UQ\cdot	Radical Ubisemiquinona

2. Resumen

El síndrome metabólico (SM) es un conjunto de desórdenes metabólicos, los cuales incrementan el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares o diabetes mellitus tipo 2 (DM₂). El estrés oxidante es uno de los mecanismos implicados en la asociación entre el SM y las enfermedades cardiovasculares debido al aumento de ácidos grasos libres (AGL), triglicéridos (TG) y leptina (LEP) que están involucrados en la generación de ERO. Por otro lado las células de músculo liso son el componente celular de la pared vascular que provee integridad estructural y regula la contracción y relajación. Estas células son importantes en la formación y desarrollo de los vasos sanguíneos durante la vasculogénesis y angiogénesis, por lo que representan un componente dinámico de la vasculatura. Sin embargo, cuando se produce un desbalance en el estado redox las células del músculo liso vascular (CMLV) sufren cambios en el fenotipo contráctil adquiriendo un fenotipo sintético implicado en el desarrollo de la placa aterosclerótica.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en CMLV aisladas de aorta de ratas con SM inducido por alto consumo de sacarosa durante 24 semanas. Al final de este periodo los animales desarrollaron todos los parámetros necesarios para el diagnóstico del SM. Asimismo los animales desarrollaron hiperleptinemia y un aumento de AGL circulantes. En cuanto a la generación de ERO, los resultados muestran que las células aisladas de los animales con SM presentaron mayor producción de ERO que las células controles. En presencia de ácido palmítico (AP) y de LEP, la generación de ERO aumentó en ambos tipos de células siendo más sensibles las células con SM. La pre-

incubación de las CMLV con un inhibidor de la NADPH oxidasa (Nox), con n-acetilcisteína (NAC) un antioxidante y precursor de la síntesis de glutatión y con un mimetizador de la superóxido dismutasa (SOD), sugiere que la Nox participa de una manera importante en la liberación de ERO en las CMLV aisladas de los animales con SM ya que es una de las principales fuentes de ERO en el tejido vascular. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de algunas subunidades de la Nox tales como la p22 y la p47. No se observó diferencia significativa en el contenido de catalasa y SOD entre CMLV controles y con SM, enzimas claves en la neutralización de ERO sin embargo, hubo un aumento en la actividad de la catalasa en las CMLV con SM, lo cual fue considerado como una respuesta al estrés oxidante generado en el SM. Por otro lado el tratamiento de las células con AP+LEP indujo un aumento en el contenido de la Cu/Zn SOD en células aisladas de animales con SM.

En conclusión, las CMLV aisladas de animales con SM generan una mayor cantidad de ERO, por lo que aumenta la actividad de la catalasa y que tanto el AP como la LEP contribuyen a una mayor generación de ERO por la vía de la Nox.

3. Summary

The metabolic syndrome (MS) is a group of metabolic disorders, which increase the risk of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus (DM₂). Oxidative stress is one of the mechanisms involved in the association between MS and cardiovascular disease due to increased free fatty acids (FFA), triglycerides (TG) and leptin (LEP) which are involved in the generation of reactive oxygen species (ROS). On the other hand, smooth muscle cells are the cellular component of the vascular vessels that provides structural integrity, regulate the contraction and relaxation in response to stimuli, and are important in the formation and development of blood vessels during vasculogenesis angiogenesis. However, when an imbalance occurs in the redox state the vascular smooth muscle cells (VSMC) undergo changes from contractile to synthetic phenotype a process involved in the development of atherosclerosis. The aim of this study was to evaluate the generation of ROS in VSMC isolated from rat aorta with MS induced by high consumption of sucrose for 24 weeks. At the end of this period, the animals develop all the necessary parameters for the diagnosis of MS. Furthermore, animals develop hyperleptinemia and an increase in circulating FFA. As for the generation of ROS, the results show that VSMC isolated from animals with MS exhibit a higher production of ROS than the control cells. In the presence of palmitic acid (PA) and LEP, the generation of ROS increases in both cell types being more sensitive in VSMC from MS. In the presence of a NADPH-oxidase (Nox) inhibitor, N-acetylcysteine (NAC) as an antioxidant and glutathione precursor and in the presence of a superoxide dismutase (SOD) mimetic the decreased ROS generation in both C and MS VSMC, suggests that Nox is a major source of ROS generation in VSMC.

However, no statistically significant differences were observed in the content of some subunits Nox such as p22 and p47. Regarding catalase and SOD, key enzymes in neutralizing superoxide anion and hydrogen peroxide, no difference in the contents was observed between C and MS. Nevertheless, an increase in catalase and SOD-Cu/Zn activities was observed in VSMC from MS. This increase may be considered as a response to oxidative stress generated in the MS. Furthermore, treatment of cells with PA+LEP induces an increase in the content of SOD-Cu/Zn in isolated cells from animals with MS. In conclusion, VSMC isolated from animals with MS generate a greater amount of ROS and therefore the activity of the catalase is increased and both the PA as LEP contributes to increased generation of ROS by Nox pathway.

4. Introducción

El SM es un conjunto de factores de riesgo tales como la obesidad, resistencia a la insulina (RI) e hipertensión arterial (HTA), que predisponen al desarrollo de enfermedades cardiovasculares y DM₂¹. Además el SM se caracteriza por presentar estrés oxidante, debido a la obesidad central que está dada por un aumento en la acumulación de tejido adiposo en la cavidad intra-abdominal, este tejido está implicado en diferentes procesos fisiológicos y metabólicos, además de ser un almacén de energía, se encarga de secretar varias hormonas importantes, siendo las más abundantes la leptina y adiponectina, junto con una amplia gama de otras proteínas y factores involucrados en vías de señalización, además de jugar un papel muy importante en la deposición y liberación de ácidos grasos². Por lo tanto el aumento del tejido adiposo puede inducir la liberación de varias adipocinas, citocinas y AGL a los tejidos periféricos, los cuales inducen una generación excesiva de ERO y lipotoxicidad la cual es un factor de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis, debido a que las ERO participan en diferentes procesos fisiopatológicos tales como la diferenciación, proliferación y muerte celular por necrosis o por apoptosis³.

El estado redox de la célula va a depender de la generación de ERO y especies reactivas de nitrógeno, así como de los mecanismos de defensa de la célula que incluye las enzimas SOD, glutatión peroxidasa (GPx), catalasa y compuestos como el ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutatión, carotenoides, flavonoides y otros antioxidantes⁴.

En el sistema vascular, numerosas evidencias experimentales y clínicas indican que el estado redox intracelular juega un papel importante como modulador de varias

funciones celulares tales como la proliferación celular, migración, angiogénesis adhesión celular y apoptosis. Por lo tanto la sobreproducción de ERO constituye un elemento clave en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares por su participación en la modulación de varias vías de señalización celular sensibles a cambios en el estado redox, tales como canales iónicos, fosforilación de proteínas, control de la expresión de proteínas y modulación de genes, etc⁵.

La producción de ERO está íntimamente involucrada en muchos de los procesos que llevan al crecimiento hipertrófico y proliferativo de las CMLV. La proliferación y migración de las CMLV son considerados de los eventos patogénicos más significativos a nivel vascular. Aunque el mecanismo molecular preciso de proliferación y migración de CMLV no está totalmente elucidado, se ha demostrado un papel activo de las ERO en el mismo⁶.

Estudios previos en nuestro laboratorio mostraron un aumento en la generación de radicales libres en animales con SM inducido por un alto consumo de sacarosa⁷; este modelo desarrolla hiperlipidemia e hiperleptinemia que se reflejan en un aumento de los AGL, LEP y estrés oxidativo. Tanto los AGL como la LEP contribuyen al aumento en la generación de ERO probablemente a través de diferentes vías como la Nox y la mitocondria.

5. Antecedentes

5.1. Síndrome Metabólico

El SM es una enfermedad que se relaciona con la obesidad y el sedentarismo, se caracteriza por la presencia, en un mismo individuo de un conjunto de desórdenes metabólicos como son la obesidad abdominal, RI e HTA¹.

En 1988, Reaven describió como “síndrome X” un cuadro caracterizado por la agrupación de diferentes factores de riesgo cardiovascular tales como hipertrigliceridemia con disminución del colesterol HDL, HTA y RI⁸. A lo largo de los últimos 25 años la definición del SM ha ido cambiando, desde 1998, diferentes organizaciones han definido qué factores están implicados en el SM, y a pesar de que los parámetros generales son similares, los puntos de corte empleados para las variables en cada definición son diferentes⁹.

5.1.1. Definición según la Organización Mundial de la Salud (OMS)

En 1998 el Grupo de Trabajo de Diabetes de la OMS propuso un conjunto de criterios para el diagnóstico clínico del SM que debía incluir evidencias de insulino-resistencia (intolerancia a la glucosa o diabetes) más otros dos factores de riesgo tales como¹⁰:

1. TG elevados ≥ 150 mg/dL (≥ 1.7 mmol/L) o disminución en el colesterol HDL < 35 mg/dL (< 0.9 mmol/L) en hombres y < 39 mg/dL (1.0 mmol/L) en mujeres.
2. Presión arterial (PA) elevada $\geq 140/90$ mmHg.

3. Obesidad, definida por el índice de masa corporal ($IMC > 30 \text{ kg m}^{-2}$) o por la relación cintura cadera.
4. Microalbuminuria $\geq 20 \text{ mg/min}$ o índice albúmina creatinina $\geq 30 \text{ mg/g}$.

5.1.2. Definición según el Programa Nacional de Educación sobre Colesterol en el Panel III para el Tratamiento del Adulto.

En 2001, el tercer informe del Programa Nacional de Educación sobre Colesterol en el Panel III para el Tratamiento del Adulto (NCEP: ATP III por sus siglas en inglés) define al SM como la presencia de por lo menos tres de las siguientes alteraciones clínicas¹¹:

1. Obesidad abdominal (Circunferencia de la cintura $\geq 102 \text{ cm}$ en hombres y $>88 \text{ cm}$ en mujeres).
2. TG $\geq 150 \text{ mg/dL}$.
3. Colesterol HDL $< 40 \text{ mg/dL}$ en hombres y $<50 \text{ mg/dL}$ en mujeres.
4. PA $\geq 130/ \geq 85 \text{ mm Hg}$.
5. Glucosa $\geq 110 \text{ mg/dL}$.

En esta definición se pone de manifiesto la importancia de la obesidad en la génesis del SM, tomando en cuenta la acumulación de grasa a nivel abdominal que se evalúa por la circunferencia de la cintura y no el IMC.

5.1.3. Definición según la Federación Internacional de Diabetes

En 2005, la Federación Internacional de Diabetes (IDF) propuso nuevos criterios, similares a los del ATP III, considerando a la obesidad abdominal como un factor necesario para el diagnóstico del SM, además de estar asociada con RI⁸.

La IDF también recomienda criterios adicionales para el diagnóstico del SM como¹²:

- Biomarcadores de tejido adiposo (adiponectina, LEP)
- Apolipoproteína B
- Lipoproteínas de baja densidad (LDL)
- Disfunción endotelial
- Albúmina urinaria
- Marcadores inflamatorios (proteína C reactiva (CRP), factor de necrosis tumoral, interleucina-6)
- Marcadores de trombosis (inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 1, fibrinógeno)

Existen diferentes definiciones del SM, sin embargo tienen criterios en común, por lo tanto en este trabajo será considerada la definición establecida por el NCEP: ATP III y algunos de los criterios adicionales establecidos por la IDF.

5.2 Estrés oxidante

El estrés oxidante se define como un aumento en los niveles de ERO y una disminución del sistema antioxidante; juega un papel importante en la patogénesis de la aterosclerosis, HTA y otras enfermedades vasculares^{13, 14}.

Las ERO son moléculas derivadas del oxígeno que comprenden dos principales grupos: radicales libres como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo (OH^{\cdot}), y derivados no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Además es importante considerar a las especies reactivas de nitrógeno (ERN) como el ON^{\cdot} y el peroxinitrito ($ONOO^-$) que no es radical libre¹⁵.

Los radicales libres han sido definidos como moléculas o fragmentos moleculares independientes que contienen uno o más electrones no apareados. Este electrón desapareado les confiere un considerable grado de reactividad. Los derivados no radicales son menos reactivos y más estables, con una vida media más larga que los radicales libres^{16, 17}; sin embargo, pueden ser generadores de radicales en lugares distantes a donde se originaron.

Actualmente las ERO están consideradas como segundos mensajeros, ya que influyen en las vías de transducción de señales en varios sistemas, incluyendo el sistema cardiovascular¹⁸.

5.2.1. Sistema antioxidante

El sistema de defensa antioxidante implica no sólo antioxidantes enzimáticos como la SOD, catalasa y GPx, sino también moléculas no enzimáticas como el glutatión, ácido ascórbico, α -tocoferol, caroteno y selenio entre otras. Estos constituyen la principal defensa contra ERO¹⁹.

La SOD actúa transformando el $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 , en humanos tres formas de esta enzima han sido descritas: SOD 1 (Cu/Zn) localizada en el citoplasma, SOD 2 (Mn) en la

mitocondria y SOD 3 (Cu/Zn) extracelular, por lo tanto la cantidad de H_2O_2 liberado de la mitocondria una de las fuentes de ERO va a depender de la actividad de la Mn/SOD localizada en la matriz mitocondrial. Esto sugiere que en las enfermedades cardiovasculares donde existe disfunción mitocondrial, la producción de ERO se encuentra exacerbada, evento que está asociado con el desarrollo temprano de lesiones ateroscleróticas²⁰.

El H_2O_2 generado por la SOD posteriormente es degradado a agua y oxígeno por la enzima catalasa, cuya sobre-expresión tiene un efecto protector en el sistema cardiovascular, tal como retraso en el desarrollo de aterosclerosis y la inhibición de la Ang II inducida por hipertrofia de la pared aórtica.

La GPx también actúa reduciendo el H_2O_2 a agua como se observa en la figura 1. La GPx es una enzima que contiene selenio en su centro activo, se encarga de catalizar la reducción de H_2O_2 e hidroperóxidos lipídicos (LO_2H) generados durante la lipoperoxidación a agua o a hidroxilo lipídico respectivamente, utilizando glutatión reducido como sustrato. Hay varias isoformas siendo la más abundante GPx1 que se encuentra en el citoplasma. En un modelo de ratones knockout para GPx1 se observó que son aparentemente sanos y fértiles, pero presentan una pronunciada susceptibilidad a la lesión por isquemia-reperfusión²¹.

En ratones deficientes en apoproteína E (Apo E), la deficiencia de GPx1 acelera y modifica la progresión de la lesión aterosclerótica.

En pacientes con enfermedad arterial coronaria, la actividad de la GPx1 se asoció inversamente con el riesgo de eventos cardiovasculares^{20, 21}.

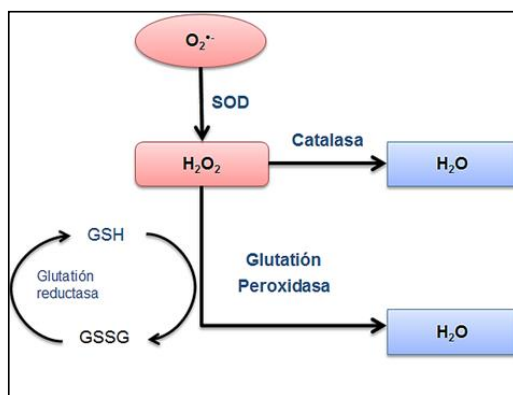


Figura 1. Reacciones llevadas a cabo por las enzimas del sistema antioxidante ²¹.

En cuanto a las moléculas antioxidantes, la mayoría de ellas reaccionan con los radicales libres cediendo un hidrógeno completo (H^+ y e^-) y neutralizando los diferentes radicales libres que se generen.

5.2.2. Estrés oxidante y SM

En los últimos años, el SM se ha asociado con estrés oxidante que se considera como un mecanismo subyacente en el desarrollo de las complicaciones cardiovasculares en el SM²². Existen evidencias clínicas que apoyan la asociación entre los componentes de SM tales con la HTA y la RI con el estrés oxidante²³. A nivel celular el estrés oxidante desencadena una serie de eventos que afectan tanto la morfología como la función de las células del tejido vascular con una disminución en la biodisponibilidad del óxido nítrico (ON^*) o la disminución en la sensibilidad a la insulina²⁴.

En individuos obesos, el aumento de las ERO en sangre procedente del tejido adiposo está asociado con la RI en el músculo esquelético, en tejido adiposo y con la patogénesis de varias enfermedades cardiovasculares tales como la HTA y aterosclerosis²⁵.

Además entre las características del SM también se encuentra un aumento de la grasa intra-abdominal que está asociada con un aumento de AGL y de otras moléculas como la leptina, las cuales pueden contribuir a la generación de ERO²⁶.

5.2.3. Estrés oxidante: efecto de los AGL

El aporte excesivo de energía y el sedentarismo en el SM inducen un aumento intracelular de glucosa y de AGL que son considerados como factor primario en el desarrollo de la RI e HTA debido a que inducen estrés oxidante y puede afectar la vía de señalización de la insulina y la disponibilidad de ON²⁷.

Altas concentraciones de AGL también están asociadas con un incremento en la oxidación de ácidos grasos, deterioro en el transporte y metabolismo de glucosa mediado por inhibición alostérica de algunas enzimas glucolíticas²⁸.

En el SM con exceso de grasa intra-abdominal existe un aumento en los niveles de AGL plasmáticos debido a la alta actividad lipolítica y a la RI¹. Varios trabajos han sugerido que los AGL inducen la generación de ERO en el tejido vascular por medio de la activación de la Nox^{29, 30}. El mecanismo por el cual los AGL activan la Nox no está bien establecido, sin embargo, recientemente se ha propuesto que los AGL estimulan el complejo Nox mediante la activación de la proteína cinasa C épsilon por

el diacilglicerol que se acumula dentro de la célula debido a la alta actividad lipogénica que provoca un exceso de AGL liberados por el tejido adiposo en el SM y obesidad, lo cual induce la fosforilación de la subunidad p47 de la Nox y adquiere mayor actividad³¹.

A nivel mitocondrial el aporte excesivo de sustratos oxidativos tales como piruvato o ácidos grasos en el SM asociado con obesidad, induce un aumento de la actividad del ciclo del ácido cítrico generando un exceso de NADH mitocondrial (mNADH) y de ERO³².

El acetyl-CoA, derivado del piruvato, o procedente de la β -oxidación de los ácidos grasos, se combina con el oxaloacetato para formar citrato, el cual se incorpora al ciclo del ácido cítrico y es convertido en isocitrato. La isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ genera NADH. Cuando el exceso de NADH supera la fosforilación oxidativa en la mitocondria, los electrones individuales en exceso se transfieren al oxígeno dando lugar a la formación de ERO y en particular aniones superóxido³³. La inhibición de la formación de ERO en la mitocondria puede lograrse impidiendo la acumulación de mNADH mediante el bloqueo de la captación de nutrimentos estimulada por la insulina y reduciendo la entrada de sustratos energéticos (piruvato, ácidos grasos) en las mitocondrias^{34, 35}.

5.2.3.1 Estrés oxidante: efecto de la LEP

La LEP es una hormona secretada por el tejido adiposo para el control de la saciedad a nivel del diencéfalo, su defecto produce hiperfagia y desarrollo de

obesidad; en pacientes obesos los niveles de LEP están elevados lo que podría implicar un defecto en su actividad³⁶. Este polipéptido hormonal es codificado por el gen de la obesidad (Ob), el cual se ha asociado con la vía de señalización de la insulina, función vascular y regulación de la PA¹⁸. Actúa a través de su receptor, el cual se expresa en placas ateroscleróticas, CMLV, también se localiza en otros tipos celulares incluyendo monocitos, plaquetas y células endoteliales, por lo que puede estar implicado en el proceso de enfermedad cardiovascular³⁷.

Varios estudios muestran que la leptina actúa sobre el endotelio induciendo la síntesis de ON^{*} a través de la activación de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS)³⁸. También actúa sobre las CMLV, evitando un aumento de Ca²⁺ citosólico inducido por angiotensina II (Ang II) y, consecuentemente, bloquea la respuesta contráctil de la aorta³⁹. Además se demostró que la LEP incrementa la actividad de la eNOS en células endoteliales y cardiomiocitos a través de la activación de las vías PI3K/Akt y JAK2/STAT3 e induce la generación de ERO en paralelo del ON^{*}⁴⁰.

Se ha sugerido una interacción entre la vía de señalización de la leptina y la vía de señalización de la insulina, debido a que se ha reportado que la unión de la LEP a sus receptores directamente mejora la fosforilación en residuos de tirosina del sustrato del receptor de insulina (IRS) 1 y 2^{41, 42}. La fosforilación de IRS sobre los residuos de serina/treonina puede disminuir la fosforilación de la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI-3K). Por lo tanto la hiperleptinemia se ha asociado con supresión de la actividad de la PI-3K, esta enzima es conocida por ser un mediador ionotrópico en el corazón y la vasculatura⁴³.

5.2.3. Fuentes de ERO en el tejido vascular.

Las ERO son producidas por todos los tipos de células vasculares incluyendo células endoteliales, CMLV, células adventicias y pueden formarse por numerosas vías enzimáticas.

Existen evidencias experimentales del papel que juega el estrés oxidante en las lesiones ateroscleróticas que son el resultado de una respuesta inflamatoria excesiva que implica la migración y proliferación de CMLV, la infiltración de células inflamatorias, la neovascularización, la producción de matriz extracelular y la acumulación de lípidos por medio de la modulación de la expresión de varias moléculas proinflamatorias y quimiotácticos⁴⁴. En las CMLV existen diferentes fuentes de ERO, incluyendo la Nox, xantina oxidasa, la cadena respiratoria mitocondrial, lipooxigenasas y el desacoplamiento de la NOS, siendo la Nox y la mitocondria las principales fuentes de ERO en este tipo celular⁴⁵.

5.2.3.1. NADPH oxidasa

La Nox es un complejo multiproteico compuesto de diferentes subunidades dependiendo del tipo celular. Las enzimas, originalmente descritas en células fagocíticas, constan de dos subunidades unidas a la membrana (la subunidad pequeña p22phox unida a la subunidad catalítica Nox2) y tres subunidades citosólicas, Rac1 (en las células no fagocíticas) o Rac2 (en células fagocíticas), p47phox y p67phox, que son reclutadas tras la activación del complejo Nox/p22phox unido a la membrana como muestra la figura 2. Todas las CMLV expresan p22phox,

mientras que la subunidad catalítica puede ser Nox1, Nox2, Nox4 o Nox5. La distribución de las subunidades catalíticas en CMLV es específica del tejido y la especie. Por ejemplo, las CMLV aórticas expresan Nox1 y Nox4 en roedores y también Nox5 en humanos. La expresión de p47phox y Rac1 está bien documentada, mientras que la de p67phox es controversial. Las ERO derivadas de la Nox han sido implicadas en hipertrofia, proliferación, migración e inflamación de las CMLV⁴⁰.

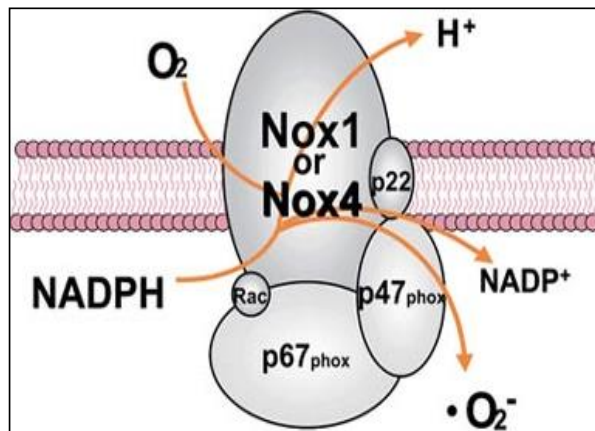


Figura 2. Subunidades que conforman el complejo de la Nox⁴⁶.

5.2.3.2. La mitocondria como fuente de ERO

En condiciones fisiológicas entre 1 y 2% del total de oxígeno que se consume en la mitocondria para la producción de ATP se convierte en O₂⁻. En condiciones patológicas esta proporción puede exacerbarse induciendo estrés oxidante. Durante la fosforilación oxidativa la primera especie reactiva que se forma es el O₂⁻, quien rápidamente se convierte en H₂O₂ por dismutación espontánea o por la acción de la

Mn/SOD localizada en la matriz mitocondrial⁴⁷. En la cadena transportadora de electrones (CTE) se ha identificado al complejo I y el complejo III como los principales formadores de ERO. El complejo I forma el $O_2^{\bullet -}$ del lado de la matriz mitocondrial y el complejo III en la interfase del ciclo Q, genera el $O_2^{\bullet -}$ tanto del lado de la matriz, como del lado de espacio inter-membranal, siendo el lado de la matriz donde lo genera en mayor proporción, tal como se observa en la figura 3. En este último complejo también se forma el radical ubisemiquinona (UQ^{\bullet}) en el espacio intermembranal, el cual es altamente reactivo y tiene una vida media muy corta, lo cual hace que reaccione rápidamente con el oxígeno y se forme $O_2^{\bullet -}$ ^{48, 49}. Las ERO derivadas de la mitocondria han sido implicadas en la regulación del tono vasomotor (vasoconstricción de la arteria pulmonar y la vasodilatación de la arteria cerebral).

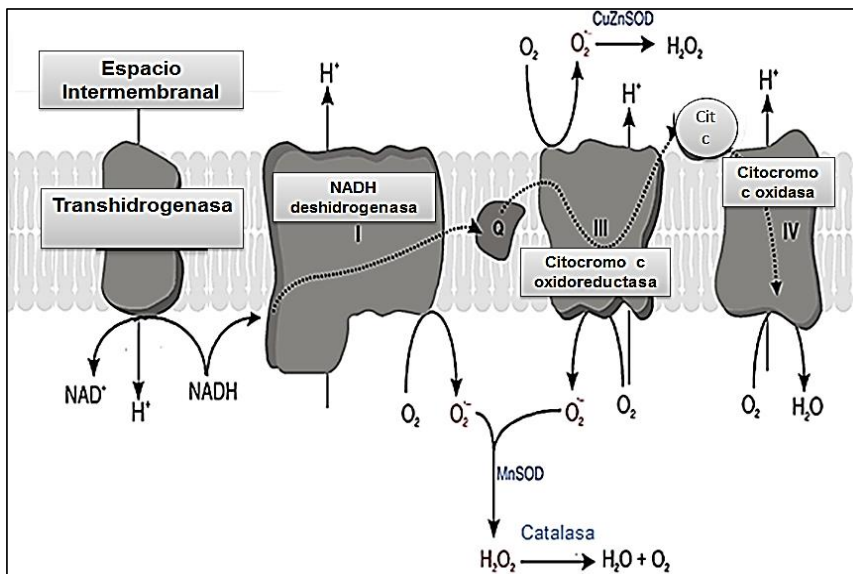


Figura 3. Generación de ERO a nivel del complejo I y III de la cadena respiratoria mitocondrial⁵⁰.

5.3. CMLV y su papel en la fisiopatología vascular

Las CMLV son el componente celular de la pared de los vasos sanguíneos que regula su diámetro y provee integridad estructural por procesos de contracción y relajación en respuesta a un estímulo, son importantes en la formación y desarrollo de los vasos sanguíneos durante la vasculogénesis, angiogénesis y representan un componente dinámico de la vasculatura⁵¹.

En los vasos sanguíneos del adulto presentan un bajo rango de proliferación, baja actividad sintética y expresan un repertorio único de proteínas contráctiles específicas (miosina de cadena ligera, α -actina, caldesmona y calponina), canales iónicos y receptores de membrana que regulan el proceso de diferenciación, en estados tempranos de desarrollo ocurre lo contrario⁵². Se ha descrito que la generación de ERO está implicada en la pérdida del fenotipo contráctil de las CMLV. En condiciones normales las CMLV tienen un fenotipo contráctil diferenciado, pero en caso de alguna lesión las CMLV pueden sufrir hipertrofia o adoptar un fenotipo des-diferenciado y aumentan el rango de proliferación, migración y sintetizar en exceso proteínas de matriz extracelular y al mismo tiempo disminuir la expresión de proteínas de fenotipo contráctil⁵³. Por lo tanto la modulación del fenotipo de las CMLV es un proceso muy importante debido a que puede estar relacionada con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares como la restenosis una reducción gradual del lumen de la arteria, aterosclerosis e hipertensión.

En la restenosis se ha descrito que las CMLV adquieren un fenotipo des-diferenciado por lo tanto empiezan a migrar hacia la íntima, aumenta el rango de proliferación y

secretan una gran cantidad de matriz extracelular⁵⁴. Durante la aterosclerosis ocurren procesos similares debido a factores de crecimiento y a mediadores inflamatorios liberados por macrófagos, las CMLV sintetizan colágeno y liberan metaloproteinasas de matriz⁵⁵. Estos son algunos de los procesos asociados a las CMLV que contribuyen al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, además estas patologías también se relacionan con la RI.

5.4. RI y enfermedades cardiovasculares.

La RI tiene lugar en tejidos sensibles a la insulina asociados con la homeostasis de la glucosa, como el músculo esquelético, el tejido adiposo y el hígado. La presencia de RI en el corazón y en los vasos aún se encuentra en debate.

En el SM, la hiperinsulinemia favorece la estimulación de acciones celulares que son independientes de la RI. La RI reduce el metabolismo del transporte de glucosa que conlleva en última instancia a la síntesis de glucógeno y de lípidos; pero no se bloquea la ruta de la proteína cinasa activadora de mitógenos (MAPK) que estimula la proliferación de CMLV, producción de moléculas de adhesión celular y disminución de la síntesis de ON^{*}⁵⁶. En las células endoteliales la estimulación de los receptores de insulina (por insulina o IGF) activa la vía PI3K, pero a diferencia de lo que sucede en los tejidos metabólicos, en la célula endotelial se aumenta la síntesis de ON^{*}, que produce vasodilatación, inhibe la proliferación del CMLV y la angiogénesis a través del aumento de GMPc. La disfunción endotelial presente en sujetos con RI o SM es en parte resultado de la disminución en la generación de ON^{*}.

La interacción de la insulina con su receptor en CMLV activa la vía PI3K y de las MAPK; esta última inicia eventos pro-aterogénicos, como la proliferación y la migración de células desde la media hacia la íntima. Numerosos estudios in vitro permiten especular que la RI en el tejido vascular provoca la regulación negativa de la vía PI3K sin afectar la vía MAPK⁵⁷.

Se ha descrito que las CMLV son sensibles a IGF1 e IGF2, pero resistente a la insulina debido a una disminución en la expresión del receptor de insulina (IR) y el deterioro en la vía de señalización. Por otra parte las CMLV de la aorta humana expresa de manera abundante el receptor de IGF1 (IGF1R) que probablemente modula la RI en las CMLV de la aorta⁵⁸. También se ha descrito que el silenciamiento del gen IRS2 que codifica para el IRS2 predice el desarrollo de aterosclerosis en un modelo de hipercolesterolemia inducida por ablación de la proteína ApoE en un modelo murino^{59, 60}.

Además en células sanguíneas mononucleares aisladas de pacientes con SM y RI, la expresión de IRS2 y Akt2 esta disminuida en comparación con pacientes con SM con sensibilidad a insulina, lo que sugiere una relación mecanística entre la reducción de expresión del IRS2 y las enfermedades metabólicas. En CMLV y macrófagos en cultivo primario, una inactivación parcial de IRS2, Akt2 y las vías Ras/ERK1/2 aumenta la expresión de MPC1 (transportador de piruvato mitocondrial 1) y CD36 (translocasa de ácidos grasos), así como la expresión del receptor scavenger de LDL en macrófagos induciendo mayor absorción de LDL modificadas por acetilación. También se ha demostrado que el pre-tratamiento de las CMLV con Ang II induce una regulación a la baja del IRS-1 dependiente de la generación de ERO^{61, 62}.

En condiciones de obesidad, las células blanco de la insulina (hepatocitos, miocitos, adipocitos) pierden sensibilidad a la insulina^{63, 64}. Debido al aumento en la oxidación de los ácidos grasos que contribuye a la sobre-producción de acetil-CoA, la cual inhibe la actividad de la piruvato deshidrogenasa y eleva los niveles de citrato que entran al ciclo del ácido cítrico. El citrato incrementa la cantidad de ATP/ADP lo cual provoca la inhibición de la glucólisis ya que se reduce la actividad de la fosfofructocinasa y consecuentemente el flujo de glucosa, resultando en acumulación tanto de la glucosa-6-fosfato, inhibición de la hexoquinasa II y finalmente en la reducción de la captación de glucosa.

Además se genera una disfunción mitocondrial, los complejos de la cadena transportadora de electrones disminuyen su actividad y se produce un aumento en la generación de ERO^{65, 66}.

También se ha postulado la inhibición de la vía de señalización de la insulina por AGL, la cual incluye la activación de las cinasas PKC, IKKb, JNK, y p38 MAP cinasa⁶⁷.

5.4.1. Vía de señalización de la insulina

La acción de la insulina se inicia cuando ésta hormona se une a su receptor, el cual activa tres vías diferentes: la vía PI3K, MAPK y CAP (proteína asociada a Cbl), siendo la vía de PI3K la que se encuentra involucrada principalmente en el transporte de glucosa⁶⁸.

El IR forma parte de la familia de los receptores de tirosina cinasas. Es un heterodímero constituido por 2 subunidades α ($IR\alpha$) ubicadas extracelularmente y

dos subunidades β (IR β) intracelulares unidas por una región intermembranal. Cuando la insulina se une a la subunidad α del IR induce la transducción de la señal hasta la subunidad β activando el dominio cinasa y llevando a cabo la autofosforilación de los residuos de tirosina de la subunidad β . La autofosforilación de los residuos de tirosina del IR β , estimulan la actividad catalítica del dominio cinasa del IR, el cual recluta otras proteínas como IRS1 e IRS2. El IRS1 o IRS2 fosforilado, fosforila a la proteína PI3K, la cual a su vez fosforila específicamente fosfatidilinositoles para formar fosfatidil inositol 3, 4, 5 trifosfato (PIP₃), induciendo el incremento de fosfoinosítidos. El aumento de fosfoinosítidos induce la fosforilación de proteínas cinasas de residuos de serina/treonina, como la proteína cinasa dependiente de fosfoinosítidos (PDK-1), que activa a Akt hacia la membrana. Existe suficiente evidencia de que la PI3K activada por insulina es capaz de habilitar el proceso de translocación del transportador 4 de glucosa (GLUT 4) mediante Akt⁶⁹. La Figura 4 muestra que Akt también está involucrada en otros procesos como la inhibición de la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3), el factor de transcripción FOXO1 y la activación de mTOR⁴⁸.

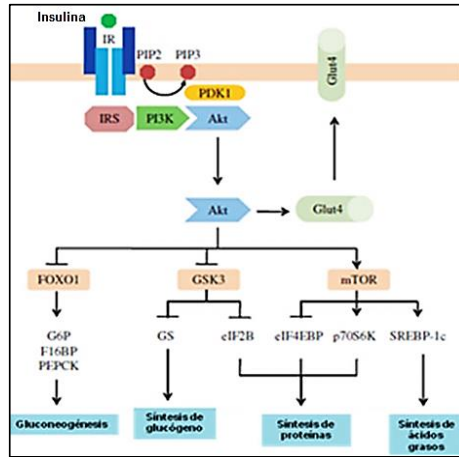


Figura 4. Vía de señalización de la insulina ⁴⁸.

5.4.2. Otras acciones de la insulina.

La insulina además de regular la internalización de la glucosa en el músculo esquelético y tejido adiposo⁷⁰, regula numerosos mecanismos de transporte iónico a través de la membrana plasmática, por ejemplo estimula la bomba Na^+/K^+ ATPasa (la cual mantiene el balance normal del K^+ intracelular y extracelular) y regula la bomba Ca^{2+} ATPasa (que mantiene los niveles basales de Ca^{2+} intracelular). En condiciones de RI la actividad de la bomba Na^+/K^+ ATPasa puede disminuir resultando en un aumento de la contracción vascular y de la presión sanguínea⁷¹, por otra parte afecta la permeabilidad membranal del Ca^{2+} alterando la función de las células endoteliales, del músculo liso y del músculo cardíaco contribuyendo a procesos de isquemia y disfunción contráctil⁷².

En el tejido vascular contribuye a la regulación del tono vascular. En condiciones de RI hay un aumento en Ca^{2+} libre intracelular debido a un aumento en la actividad de la bomba Ca^{2+} ATPasa que resulta en vasoconstricción vascular e HTA⁷³.

Además el Ca^{2+} intracelular regula la sensibilidad a la insulina. En los adipocitos obtenidos por biopsia abdominal en ancianos obesos se observó que la inhibición del transporte de Ca^{2+} a través de la membrana celular produce un incremento de la sensibilidad a la insulina⁷⁴. En el mismo sentido, la inhibición del Ca^{2+} con nitrendipina, diltiazem o amiloride, los cuales son bloqueadores de canales de Ca^{2+} , mejora la tolerancia a la glucosa y reduce las concentraciones de glucosa o de la insulina en pacientes obesos con HTA y RI^{75, 76}.

Los mecanismos por los que el Ca^{2+} intracelular ejerce su acción celular son todavía poco conocidos pero podrían centrarse en varios aspectos. El incremento de Ca^{2+} intracelular en los adipocitos así como en el músculo esquelético compromete la eficiencia de la captación de glucosa estimulada por insulina, debido a la incapacidad de ésta para inducir la desfosforilación del GLUT4, disminuyendo su capacidad para transportar la glucosa⁴⁷. Es también posible que un incremento de Ca^{2+} contribuya al desarrollo de la RI a través de la activación de la PKC, lo que produce la fosforilación en residuos de serina de la subunidad β del IR, lo cual se traduce en su inactivación⁷⁷.

En las células endoteliales la insulina estimula la generación de ON^* , el cual es un vasodilatador actúa sobre el músculo liso regulando el tono vascular. Esto, a su vez, inhibe la formación de lesiones que dependen de la migración y proliferación de las

CMLV, atenuando la adhesión de células inflamatorias en la pared vascular e inhibe la agregación de las plaquetas reduciendo la trombosis. Sin embargo, la insulina también promueve una serie de efectos deletéreos en el tejido vascular, estimulando la acción de varios factores de crecimiento que actúan a través de la vía de la MAPK. La MAPK media los efectos de la insulina y de la Ang II con la producción del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) en las CMLV atenuando la fibrinólisis. También la activación de la MAPK por insulina promueve factores de crecimiento de CMLV y de su migración. Por otro lado las tiazolidinedionas que aumentan la sensibilidad a la insulina, que actúan como ligandos para el Receptor Activado por el Proliferador Peroxisomal gamma (PPAR γ) inhiben la proliferación de las CMLV y su migración hacia la íntima⁷⁸.

6. Justificación

El SM inducido por una dieta alta en sacarosa presenta varias alteraciones metabólicas que se reflejan en un aumento de varios parámetros entre ellos los niveles de LEP y AGL en la circulación, este incremento puede afectar el funcionamiento de la pared vascular de las arterias aumentando el riesgo de enfermedades. Tanto la LEP como los AGL pueden contribuir a la disfunción vascular a través de la generación de ERO y disminuyendo la disponibilidad de ON^{\bullet} , provocando una alteración del tono vascular que puede contribuir al desarrollo de HTA o inducir un cambio de fenotipo contráctil que se refleja en su proliferación.

Debido a la implicación que tienen las ERO generadas a partir de la LEP y los AGL en la alteración de diferentes procesos primordiales para las CMLV como el cambio de fenotipo contráctil a un fenotipo sintético y proliferativo es importante elucidar el mecanismo por el cual las ERO están generando estas alteraciones para poder comprender como contribuyen al desarrollo de estados patológicos e identificar que moléculas participan de manera importante como para ser consideradas un blanco terapéutico.

7. Hipótesis

La leptina y el ácido palmítico inducirán mayor generación de especies reactivas de oxígeno en células de músculo liso vascular aisladas de animales con síndrome metabólico, a través de la vía de la NADPH oxidasa.

8. Objetivo General

Elucidar el mecanismo por el cual la LEP y los AGL generan ERO y cómo afectan proteínas involucradas en la vía de señalización de la insulina en CMLV de un modelo de SM.

9. Objetivos Particulares

- Evaluar la generación de ERO en CMLV de animales con SM.
- Evaluar el efecto de los AGL y la LEP sobre la generación de ERO en CMLV.
- Evaluar la expresión y actividad de enzimas antioxidantes en CMLV tratadas con LEP y AGL.
- Analizar la expresión de IR- β , IRS y Akt en presencia de LEP y AGL.

10. Material y métodos

10.1. Antecedentes generales del modelo de SM

El modelo animal de SM desarrollado en nuestro laboratorio (ratas Wistar machos)⁷⁹ es una variante del desarrollado anteriormente por Reaven⁸⁰. Estos modelos se inducen por dietas hipercalóricas altas en fructuosa o sacarosa por un determinado periodo de tiempo, así los animales desarrollan HTA, hipertrigliceridemia, hipertinsulinemia y RI. Esto refleja el cuadro clínico que se observa en humanos con SM.

Nuestro modelo en particular, es inducido por el consumo de sacarosa (azúcar refinada comercial) al 30% en el agua de bebida durante 24 semanas.

El modelo ha sido caracterizado y los resultados obtenidos acerca de este son:

- Hipertrigliceridemia e HTA⁸¹.
- Aumento en la grasa visceral, en los AGL y en los TG circulantes⁸².
- Alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos, incluyendo cambios en las actividades de las enzimas de desaturación que son clave en la biosíntesis de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados^{82, 83, 84}.
- Aumento en las ERO a nivel mitocondrial que generan estrés oxidante en el hígado, así como una disminución en las defensas antioxidantes tales como el glutatión, vitamina E y actividad de catalasa⁷.
- En el tejido vascular también se han encontrado cambios en la reactividad vascular en anillos de aorta y aumento en la generación de ERO a través de la Nox en los animales con SM²³.

10.2. Modelo experimental de SM

Se utilizaron ratas macho Wistar recién destetadas con un peso aproximado de 40 g, las cuales fueron obtenidas del bioterio del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, posteriormente se dividieron en dos grupos de 6 ratas cada uno:

Grupo C: recibió alimento sólido (Lab diet fórmula 5008, Ralston Purina Corp., St Louis, MO) y agua *ad libitum*.

Grupo SM: recibió como agua de bebida una solución de sacarosa (azúcar refinada) al 30% y el mismo alimento sólido (Lab diet fórmula 5008, Ralston Purina Corp., St Louis, MO) *ad libitum*.

Después de 24 semanas de tratamiento, las ratas estuvieron en ayuno toda la noche y al día siguiente fueron sacrificadas por decapitación.

10.3. Análisis de AGL, TG, glucosa, insulina y LEP

La sangre se recolectó de la aorta abdominal en tubos con anticoagulante (EDTA al 0.1%) y se centrifugó inmediatamente a 600 x g durante 20 min a 4 °C . Al plasma obtenido se le añadió butilato de hidroxitolueno al 0.005% como antioxidante, se almacenó a -70°C hasta la cuantificación de los lípidos e insulina.

Los AGL se determinaron por cromatografía y se obtuvieron según el método de Folch⁸⁵. La concentración de TG en plasma se midió según el método descrito por Nägele⁸⁶. Los niveles de glucosa, insulina y leptina en plasma se midieron por radioinmunoensayo utilizando kits comerciales estándar (Linco Research), cada ensayo comercial se calibró con estándares del fabricante.

La grasa intra-abdominal, una característica importante del SM, un marcador de RI y una fuente de AGL, se diseccionó de la cavidad retroperitoneal y alrededor de ambos riñones e inmediatamente se pesó. La grasa visceral y duodenal no se incluyó en este procedimiento.

10.4. Cultivo primario de CMLV

Las CMLV se obtuvieron de la aorta de la rata. Se extrajo la aorta de la rata en condiciones estériles después de haberla sacrificado. Inmediatamente el tejido se colocó en un buffer que contenía 140 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM Na₂HPO₄, 2.4 mM MgSO₄, 2 mM CaCl₂, 5.6 mM Glucosa, 0.02 mM EDTA, 25 mM HEPES, pH 7.4 y se retiró la grasa.

En una primera etapa la aorta se incubó con 1 mg/ml de colagenasa (Gibco) durante 20 min para despegar el adventis (fibroblastos) del músculo liso. La segunda etapa consistió en incubar la aorta sin adventis 40 min con 10 mM papaína (Roche) para disgregar las células.

Posteriormente las CMLV obtenidas fueron filtradas a través de un tamiz con un poro de 230 µm (Tissue Grinder Kit, Sigma) y sembradas en cajas de cultivo de 25 cm² (Corning) en un medio de cultivo D-MEM/F-12 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB) (Gibco) inactivado a 56°C durante 30 min, las CMLV fueron colocadas en una incubadora (Forma Scientific Steri Cult 200) a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad. Cuando las células llegaron a confluencia se dispersaron

con 0.25% tripsina-EDTA (Gibco) y se re-sembraron en una caja de 75 cm². En el mismo medio de cultivo descrito anteriormente.

10.5. Tratamiento de las CMLV para la determinación de IR β , IRS1 y Akt

Después de llegar confluencia las células adheridas fueron tratadas nuevamente con 0.25% tripsina-EDTA y se resembraron en cajas de Petri y cuando llegaron a un 80% de confluencia, las células fueron tratadas de tres formas: con 100 μ M AP, 20 ng LEP o una combinación de ambos (AP+LEP) durante 24 h a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad.

10.6. Obtención de proteína

Después del tratamiento las células se lavaron 2 veces durante 5 min con PBS (1 mM KH₂PO₄, 154 mM NaCl, 4.5 mM Na₂HPO₄•7H₂O pH 7.4), posteriormente las células fueron despegadas de las cajas Petri con tripsina-EDTA al 0.25%, y se centrifugaron a 700 x g durante 5 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 200 μ l de buffer de lisis (25 mM HEPES, 0.1 M NaCl, 15 mM Imidazol, 10% glicerol, 1% Triton X-100) con inhibidores de proteasas (115 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), 2 mM leupeptina, 1.5 mM aprotinina, 3 mM pepstatina) y antifosfatasas (0.2 mM ortovanadato, 50 mM NaF), se incubó por 30 min a 4°C. Por último se realizó la cuantificación de proteína por el método de Bradford⁸⁷.

10.7. Cuantificación de proteína por Bradford

Se realizó una dilución de las muestras (1:100), se tomaron 100 μl de la dilución y todas las muestras se llevaron a un volumen de 800 μl con H_2O , posteriormente se agregaron 200 μl del reactivo de Bradford (BioRad) y se incubaron durante 5 min para finalmente analizar las muestras en un espectrofotómetro (Beckman) a una longitud de onda de 595 nm.

La curva de calibración se realizó con albúmina de suero bovino (ASB), la cual se preparó a partir de una solución de 1mg/ml, tomando 2.5, 5, 7.5 y 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ como puntos de referencia.

10.8. Electroforesis y Western blot

En geles SDS-PAGE al 8% y 10% se depositaron 80 μg de proteína de cada muestra para la detección de IR β , IRS-1, Akt, GAPDH y β -actina, estos últimos se tomaron como controles de carga. Mientras que para la detección de las enzimas antioxidantes tal como Cu/Zn SOD, Mn SOD, Catalasa, p22 y p47, se realizaron geles de gradiente de 7.5% al 20%. Ambos tipos de geles se corrieron en un buffer 190 mM Glicina, 25mMTris, 1%SDS. La transferencia se realizó en medio húmedo en membrana de PVDF (Millipore) a 350 mA durante 120 min para IR β e IRS y 90 min para Akt, β -actina, SOD Cu/Zinc, SOD Mn, Catalasa, p22, p47 y GAPDH. Se utilizaron anticuerpos primarios policlonales IR β (Santa Cruz Biotechnology, 1:500), IRS-1 (Santa Cruz Biotechnology, 1:500), SOD Cu/Zinc (Santa Cruz Biotechnology, 1:500), SOD Mn (Santa Cruz Biotechnology, 1:500), Catalasa (Abcam, 1:1000), p22 (Santa Cruz Biotechnology, 1:500), p47 (Santa Cruz Biotechnology, 1:500) y

monoclonales Akt (Santa Cruz Biotechnology, 1:1000), β -actina(Santa Cruz Biotechnology, 1:1000) y GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, 1:1000). Finalmente la detección de las proteínas se realizó por quimioluminiscencia utilizando un kit comercial (Millipore) y placas radiográficas (Kodak).

Las bandas obtenidas en la placa que corresponden a la proteína de interés fueron analizadas con un foto-documentador de alta resolución (GelDoc-It Imaging System), con este equipo se determinó la densidad óptica (D.O.) de cada banda.

10.9. Obtención de proteína para evaluar la actividad enzimática de catalasa y SOD

Después de 24 h de tratamiento, las células se lavaron 2 veces durante 5 min con PBS y fueron despegadas de las cajas Petri con tripsina-EDTA al 0.25% y se centrifugaron a 700 x g durante 5 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 200 μ l de buffer de Sacarosa-Tris (250 mM/25 mM) pH 7.4 con inhibidores de proteasas (115 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), 2 mM leupeptina, 1.5 mM aprotinina, 3 mM pepstatina) y antifosfatasa (0.2 mM ortovanadato, 50 mM NaF) las células se lisaron por congelación en nitrógeno líquido y descongelación a 37°C. Por último se realizó la cuantificación de proteína por el método de Bradford.

10.10. Determinación de la actividad de la enzima catalasa

En un gel PAGE al 10% se depositaron 60 μ g de proteína, la electroforesis se realizó en un buffer con 190mM Glicina, 25Mm Tris-base a 130 V durante 4 h,

posteriormente el gel se lavó 3 veces con agua destilada durante 5 min y se incubó 10 min con H_2O_2 dilución 1:200 de una solución comercial al 3%, después de este tiempo se eliminó el exceso de peróxido con agua bidestilada. Para visualizar la actividad de la catalasa, el gel se incubó en una solución reveladora que contenía $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 1% y $\text{K}_3\text{Fe}(\text{C}_6\text{O}_6)$ 1% (1:1 v/v) durante 10 min. Después de este tiempo, el gel se coloreó en verde oscuro y las bandas que corresponden a la actividad de la catalasa quedaron blancas.

Para cuantificar la actividad de la enzima catalasa el gel se escaneó con un fotodocumentador de alta resolución (GelDoc-It Imaging System), posteriormente con este mismo equipo se determinó la densidad óptica (D.O.) de cada banda.

10.11. Determinación de la actividad de la enzima SOD

En un gel PAGE al 8% de bis-acrilamida se depositaron 80 μg de proteína. La electroforesis se realizó en un buffer con 190mM Glicina, 25mM Tris-base a 120 V durante 2 horas y media; posteriormente el gel se lavó con un buffer que contenía 50 mM K_2HPO_4 pH 7.8 durante 10 min. Al finalizar el lavado, el gel se incubó en el mismo buffer adicionado con 0.28 mM riboflavina, 28 mM EDTA y 0.5 mg/ml azul de tetrazolio durante 15 min. Posteriormente se eliminó el exceso de buffer y el gel se expuso a la luz blanca hasta que comenzó a teñirse de morado, excepto las bandas que corresponden a la actividad de la SOD, las cuales son blancas.

Para cuantificar la actividad de la enzima SOD el gel se escaneó con un fotodocumentador de alta resolución (GelDoc-It Imaging System) y con este mismo equipo se determinó la densidad óptica (D.O.) de cada banda.

10.12. Cuantificación de ERO a nivel celular por microscopia confocal

Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos estériles tratados con poli-L-lisina al 0.1%, una vez que las células se encontraban adheridas se trataron con 100 μ M AP, 20 ng LEP y una combinación de ambos a distintos tiempos: 24 h, 24h+15min y 15 min. Posteriormente las células fueron incubadas con diacetato 2',7'diclorodihidrofluoresceína (DCF) (5 μ M) durante 15 min, posteriormente las células se lavaron con PBS para eliminar el exceso de DCF y se fijaron con paraformaldehído al 1% durante 30 min a 4°C, se lavaron nuevamente con PBS y fueron montadas sobre portaobjetos con glicerol. El DCF oxidado fue detectado por microscopia confocal.

10.13. Efecto del DPI, NAC y Tempol sobre la generación de ERO en CMLV

Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos tratados con poli-L-lisina al 0.1%, una vez que las células se adherieron fueron incubadas con 10 μ M de DPI, NAC y Tempol, durante 15 min, después fueron incubadas con 5 μ M DCF durante 15 min, posteriormente se les aplicó tratamiento con 100 μ M AP, 20 ng LEP y una combinación de ambos durante 15 min, se lavó con PBS para eliminar el exceso de DCF y las muestras se fijaron con paraformaldehído al 1% durante 30 min a 4°C, finalmente las células se lavaron nuevamente con PBS y fueron montadas con glicerol sobre portaobjetos. El DCF oxidado fue detectado por microscopia confocal.

10.14. Análisis de imágenes

La oxidación del DCF por ERO emite una intensidad de fluorescencia.

La intensidad de fluorescencia emitida por las células tratadas con DCF fue detectada por microscopia confocal con un microscopio marca Olympus Fluoview 1.7 (λ excitación: 326 nm, una λ emisión: 432 nm), en un objetivo de 40X en el departamento de nutrición experimental del Instituto Nacional de Pediatría y analizada con un foto-documentador de alta resolución (GelDoc-It Imaging System), la intensidad de fluorescencia dada por el equipo fue dividida entre el número total de células, dicho valor corresponde a la intensidad de fluorescencia por célula.

10.15. Análisis estadístico

Los datos están presentados como la media \pm EE.M. (Error estándar de la media). Se utilizó la prueba estadística t-Student para la comparación de los diferentes grupos, los datos con una $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

11. RESULTADOS

11.1. Características generales de los animales

El tratamiento de las ratas Wistar con sacarosa al 30% durante 24 semanas indujo un incremento estadísticamente significativo de la PA, TG, AGL, insulina y LEP en plasma y una mayor acumulación de tejido adiposo intra-abdominal. Por otro lado, el análisis del colesterol total no mostró diferencia significativa entre ambos grupos, sin embargo el colesterol asociado a las HDL disminuyó en los animales tratados con sacarosa. En el peso corporal no hubo diferencia significativa (Tabla 1). Por lo tanto, el modelo animal de SM desarrollado por la administración de sacarosa al 30%, refleja el cuadro clínico observado en pacientes con este padecimiento, lo cual lo convierte en un modelo de gran utilidad para investigar el mecanismo por el cual el SM se asocia con enfermedades cardiovasculares.

Tabla 1. Características generales de los animales⁸⁵.

Variables	C	SM
Peso corporal (g)	488.0 ± 19.1	477.0 ± 31.7
Presión arterial (mm/Hg)	121.0 ± 2.2	148.2 ± 4.2 *
Grasa intra-abdominal (g)	7.4 ± 2.2	15.3 ± 2.6 *
TG (mM)	0.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1 **
Glucosa (mM)	5.9 ± 0.1	5.9 ± 0.2
Colesterol total (mM)	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.1
Colesterol-HDL (mg/dL)	42.65 ± 3.5	28.1 ± 4.1*
AGL (mM)	0.6 ± 0.1	1.1 ± 0.1 **
Insulina (µM)	99.6 ± 5.1	167.6 ± 7.8**
LEP (ng/ml)	0.6 ± 0.2	2.7 ± 0.3**

Los valores fueron expresados en promedio ± EEM (n=7 diferentes animales). Los valores de todas las variables fueron obtenidos al final del periodo del tratamiento. *p<0.05 SM vs C. **p<0.01 SM vs C.

11.2. Generación de ERO en CMLV

Las ERO son importantes a nivel fisiológico debido a que participan en la activación de algunas vías de señalización sin embargo, cuando se produce un desbalance del estado redox se producen efectos adversos. En el SM se ha reportado un aumento en los niveles de AGL los cuales pueden generar aumento de las ERO a nivel hepático. En las CMLV las ERO participan en procesos de contracción y relajación por lo que un aumento de estas, podría afectar la función en el tejido vascular; para evaluar la generación de ERO se utilizó DCF diacetato que es un fluoróforo permeable a la membrana plasmática, cuando se encuentra dentro de la célula se hidroliza a DCF libre por la acción de esterasas no específicas y es sensible a oxidación por diferentes ERO, siendo más sensible al H_2O_2 . La figura 5 muestra imágenes de microscopia confocal de CMLV en cultivo primario, incubadas con y sin DCF. Las CMLV tanto de animales control como con SM muestran una fluorescencia intrínseca, siendo mayor en las células de animales con SM. Al incubar las células con el DCF, se observa que las células de animales con SM generan 43% más ERO que las células control, esto se refleja en una mayor fluorescencia, por lo tanto esto sugiere que las células de SM producen una mayor cantidad de ERO con respecto a los controles.

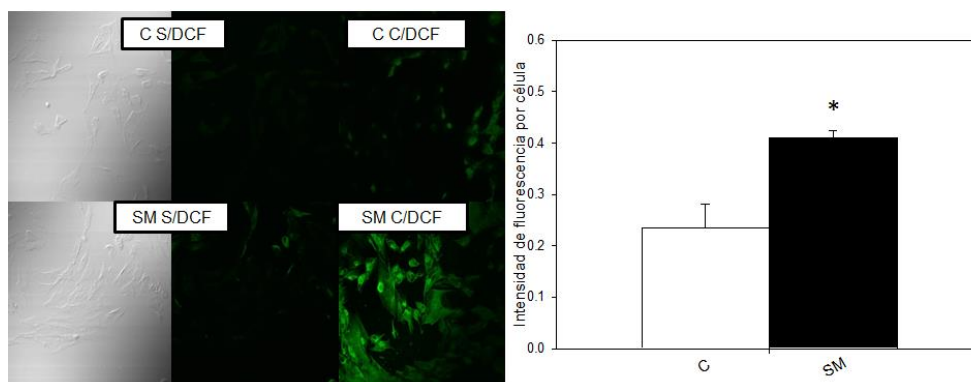


Figura 5. Generación de ERO en CMLV de ratas control (C: barra blanca) y con síndrome metabólico (SM: barra negra) analizadas por microscopia confocal, las imágenes fueron tomadas en un microscopio equipado con un objetivo 40X. Las CMLV fueron incubadas con 5 μ M DCF (C/DCF). La fluorescencia total corresponde a la suma de la fluorescencia de 20 células. Los valores corresponden al promedio de la fluorescencia emitida \pm ES (n=5 experimentos separados de 5 animales diferentes). Sin DCF (S/DCF). * $p < 0.05$ corresponde a SM vs C.

11.2.1. Efecto del AP sobre la generación de ERO en CMLV

Las CMLV control y de SM fueron tratadas con 100 μ M de AP a diferentes tiempos, debido a que es uno de los principales AGL que se incrementa en el SM. Las imágenes obtenidas por microscopia confocal (figura 6) muestran que el tratamiento con 100 μ M de AP aumenta la fluorescencia tanto en las células aisladas de animales control como con SM, siendo mayor el efecto en las células controles las cuales sufren un aumento en la generación de ERO del 50%. Además, existen diferencias significativas en la generación de ERO entre ambos grupos celulares en función del tiempo de cada tratamiento. Las CMLV de animales control con un tratamiento agudo (15 min) aumentan significativamente su fluorescencia en un 50%

con respecto a su fluorescencia basal sin embargo, las células SM con el mismo tratamiento aumentan la fluorescencia solo en un 5%. Mientras el tratamiento crónico (24 h) aumenta significativamente la intensidad de fluorescencia en ambas células, siendo mayor en las CMLV de SM donde se aumenta la generación de ERO 20% con respecto a la generación basal. Además el estímulo de 15 min con AP de las CMLV pre-tratadas con AP durante 24 h, aumenta la fluorescencia en un 76% con respecto a la fluorescencia basal en CMLV SM, el cambio es estadísticamente significativo. Este resultado sugiere que las CMLV aisladas de los animales control son más sensibles al tratamiento con AP a corto tiempo que las células aislada de animales con SM. Sin embargo, el tratamiento crónico (24 h) con AP induce mayor generación de ERO en ambas células, siendo mayor en las CMLV aisladas de animales controles que las de animales con SM. Cabe señalar que el cambio en la fluorescencia indica una mayor oxidación del DFC, lo cual refleja una mayor formación de ERO.

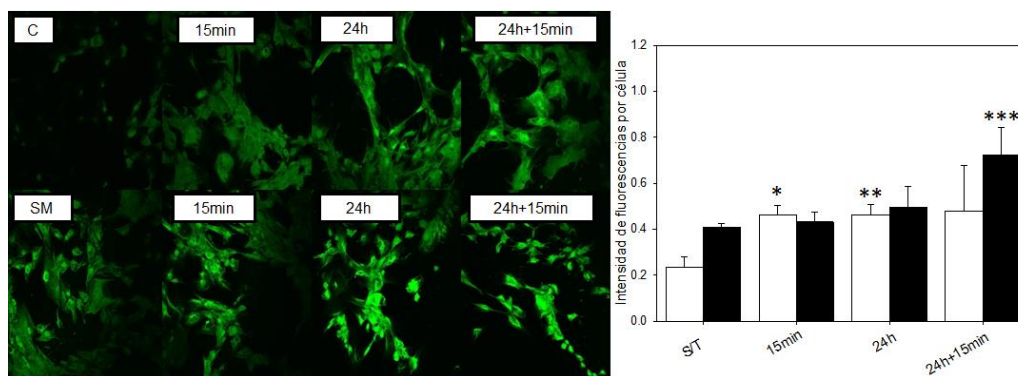


Figura 6. Efecto del AP sobre la generación de ERO en CMLV en un microscopio confocal equipado con un objetivo 40X. La figura muestra que el tratamiento de las CMLV C (barras blancas) y SM

tratadas (barras negras) con 100 μ M de AP durante 15 min, 24 h y 24+15min aumento la generación de ERO, que se refleja en un incremento de la intensidad de fluorescencia. Los valores corresponden al promedio \pm ES de la intensidad de fluorescencia de 15 células (n=4 diferentes experimentos de 4 animales diferentes). * $p < 0.05$ C vs C+AP 15min, ** $p < 0.05$ C vs C+AP 24h, *** $p < 0.05$ SM vs SM+AP 24 h+15 min.

11.2.2. Efecto de la LEP sobre la generación de ERO en CMLV

La LEP es una de las hormonas encargadas de regular el apetito en el organismo, se ha descrito un aumento en el SM, el cual puede contribuir a la generación de ERO, para corroborar esto las CMLV fueron incubadas con 20 ng de LEP durante 15 min, 24 h y 24 h con un estímulo de 15 min. En la imagen obtenida por microscopia confocal (figura 7) se observa que a los 15 min de tratamiento se induce un aumento en la intensidad de fluorescencia en ambas células, en las células controles la fluorescencia aumenta en un 66% con respecto a su fluorescencia basal y en células del modelo de SM en un 42%, por lo tanto la generación de ERO sigue siendo mayor en el SM.

El tratamiento de las células durante 24 h no aumenta la fluorescencia de ambos grupos de células de manera significativa con respecto a su estado basal. De acuerdo con estos resultados la LEP induce una mayor generación de ERO durante un tratamiento agudo (15 min) tanto en células SM como en controles. El aumento de ERO a los 15 min es estadísticamente significativo con respecto a las CMLV sin tratamiento, a diferencia de los tratamiento a largo plazo (24h y 24h+15min) donde no encontramos significancia en los cambios de fluorescencia.

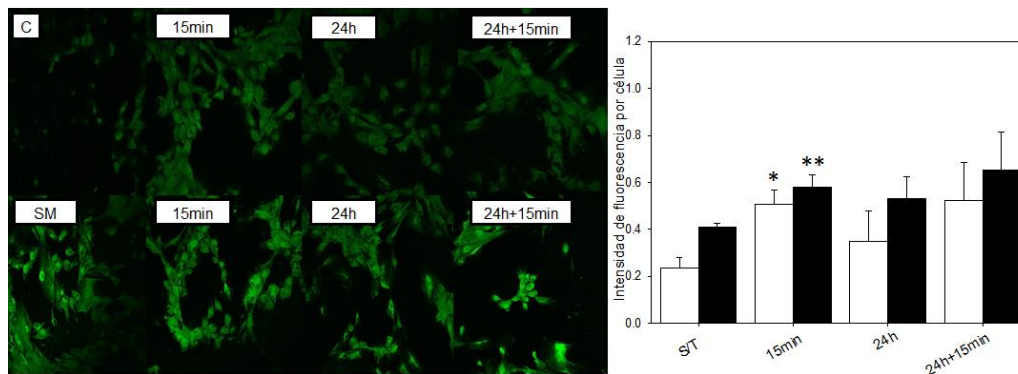


Figura 7. Efecto de la LEP sobre la generación de ERO en CMLV C y SM. Los resultados fueron obtenidos con un microscopio equipado con un objetivo 40X. Las CMLV de ratas C (barras blancas) y SM (barras negras) aumentaron la intensidad de fluorescencia después del tratamiento con LEP (20 ng) durante 15 min, 24 h y 24h+15min, debido a la oxidación del DCF por la generación de ERO. Los valores corresponden al promedio \pm ES de la intensidad de fluorescencia de 20 células (n=5 diferentes experimentos de 5 animales diferentes). *p<0.05 C vs C+LEP 15 min, **p<.05 SM vs SM+LEP 15 min.

11.2.3. Efecto del AP+LEP sobre la generación de ERO en CMLV

La figura 8 muestra imágenes de la intensidad de fluorescencia emitida por las CMLV incubadas con 100 μ M de AP y 20 ng de LEP a los diferentes tiempos, durante 15 min, 24 h y con 24 h más un estímulo de 15 min. El resultado de este experimento muestra que la incubación de las CMLV con la combinación de AP más LEP induce un aumento de más del doble de la fluorescencia basal en las células controles pero no afecta significativamente las de SM. Por otro lado se puede observar que el tratamiento combinado del AP más LEP aumenta de manera significativa la fluorescencia casi un 50% más en comparación con los tratamientos por separado

esto para CMLV de animales controles. En cuanto al tiempo de tratamiento, los 15 min son suficientes para inducir una intensidad de fluorescencia mayor o igual a 24 h.

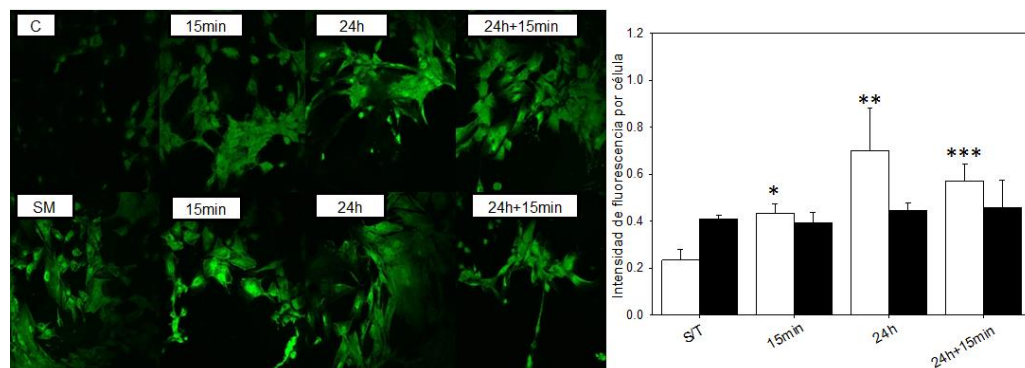


Figura 8. Efecto del AP+LEP sobre la generación de ERO en CMLV C (barras blancas) y SM (barras negras), las imágenes fueron observadas en el microscopio confocal equipado con un objetivo 40X. Las CMLV fueron tratadas con 100 μ M de AP y 20 ng de LEP durante 15 min, 24 h y 24hrs+15min. Los valores corresponden al promedio \pm ES de la intensidad de fluorescencia de 16 células (n=5 diferentes experimentos de 5 animales diferentes). * $p < 0.05$ C vs C+AP+LEP 15 min, ** $p < 0.05$ C vs C+AP+LEP 24 h, *** $p < 0.05$ C vs C+AP+LEP 24h+15min.

11.3. Efecto del DPI, NAC y Tempol sobre la generación de ERO en CMLV

La pre-incubación de las células con DPI (inhibidor de la Nox), con NAC (precursor del glutatión) y con Tempol (molécula que mimetiza la SOD), tuvo por objetivo elucidar la participación de la Nox en la generación de radical $O_2^{\bullet-}$. Cabe señalar que el DPI ha sido ampliamente utilizado como un inhibidor de la Nox pero puede también inhibir varias enzimas dependientes de NAD(P) tales como la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogena y lactato

deshidrogenasa, sin embargo, no se ha reportado la generación de ERO durante la activación de estas enzimas por lo tanto se considera que el DPI inhibe la generación del radical superóxido generado por la Nox⁸⁸.

En cuanto al NAC como precursor del glutatión participara en la reducción del H₂O₂ por medio de la GPx o modificara el sistema redox intracelular como agente reductor de los grupos tioles.

11.3.1. Efecto del DPI, NAC y Tempol sobre CMLV tratadas con AP

La figura 9 muestra imágenes de las CMLV aisladas de aorta de ratas control y con SM pre-incubadas con DPI, NAC y Tempol (15 min) y estimuladas con AP (15 min). Se observa que el DPI (inhibidor de la Nox) y el Tempol (mimetizador de la SOD) tienen un mayor efecto al reducir la fluorescencia de las CMLV control y SM en mayor proporción en comparación con el NAC, es decir que tanto el DPI como el Tempol disminuyen la generación de ERO. En el análisis estadístico de estas muestras observamos que los compuestos que disminuyen significativamente la intensidad de fluorescencia generada por el tratamiento con AP son el DPI y el Tempol aproximadamente en un 55 % con respecto a las células tratadas solo con AP, solo que el Tempol a diferencia del DPI produce esta disminución tanto en CMLV controles como de SM y la disminución de la fluorescencia debida al DPI en las células controles es mínima y no es estadísticamente significativa a diferencia de su efecto en el SM que si muestra significancia de la misma forma que el efecto de Tempol, lo cual se refleja en una disminución de ERO.

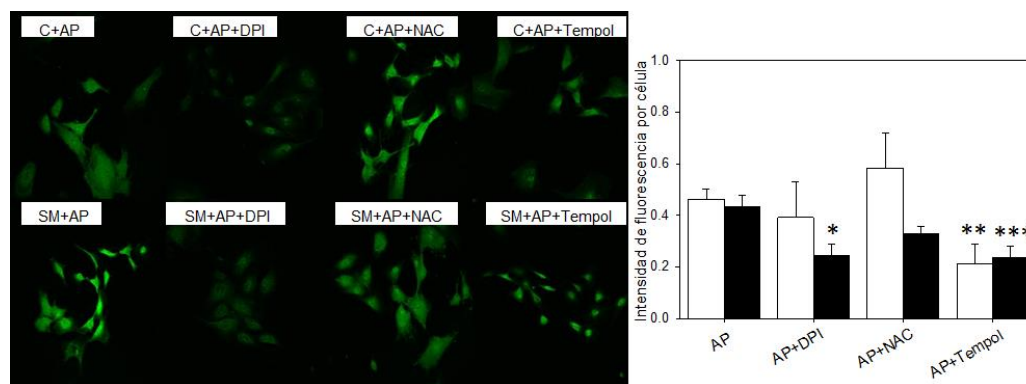


Figura 9. Efecto del DPI, NAC y TEMPOL sobre la generación de ERO inducida por AP. Las CMLV de ratas C (barras blancas) y SM (barras negras) están tratadas con 5 μM DCF, 100 μM de AP e incubadas con diferentes compuestos con actividad antioxidante (DPI, NAC, Tempol) en una concentración 10 μM . Las imágenes fueron observadas en el microscopio confocal equipado con un objetivo 40X. Los valores corresponden al promedio \pm ES de la intensidad de fluorescencia de 18 células (n=3 diferentes experimentos de 3 animales diferentes). * $p < 0.05$ SM vs SM+DPI, ** $p < 0.05$ C vs C+Tempol, *** $p < 0.05$ SM vs SM+Tempol.

11.3.2. Efecto del DPI, NAC y Tempol sobre CMLV tratadas con LEP

En la figura 10 observamos que al tratar las CMLV con 20 ng de LEP e incubar con los diferentes compuestos con actividad antioxidante (DPI, NAC y Tempol) ambos producen una reducción de la fluorescencia, es decir una disminución de ERO la cual es más evidente en el SM. Si comparamos el efecto que tienen estos compuestos ambos producen una disminución aproximadamente del 47 % en las células con SM con respecto a las controles, donde la generación de ERO disminuye solo un 10 %. El efecto del DPI, NAC y Tempol sobre las ERO inducidas por la LEP es estadísticamente significativo para las células obtenidas del modelo de SM.

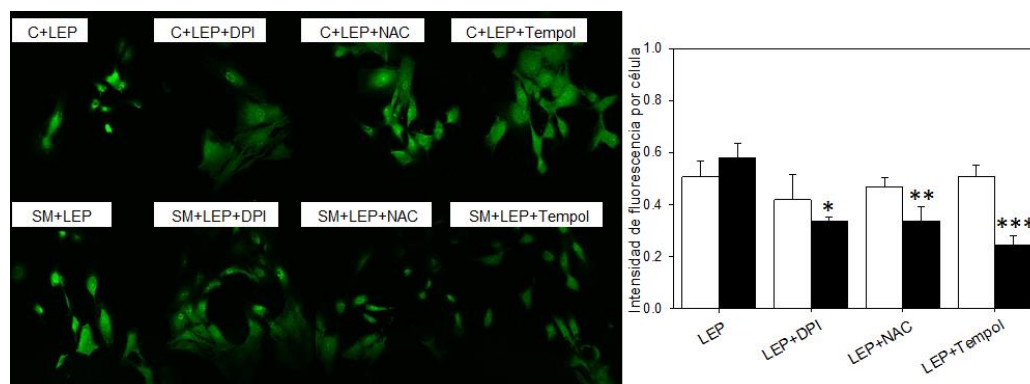


Figura 10. Efecto del DPI, NAC y TEMPOL sobre la generación de ERO inducida por LEP. Las CMLV de ratas C (barras blancas) y SM (barras negras) están tratadas con 5 μM DCF, 20 ng de LEP e incubadas con diferentes compuestos con actividad antioxidante (DPI, NAC, Tempol). Los valores corresponden al promedio \pm ES de la intensidad de fluorescencia de 15 células ($n=3$ diferentes experimentos de 3 animales diferentes). * $p<0.05$ SM vs SM+DPI, ** $p<0.05$ SM vs SM+NAC, *** $p<0.05$ SM vs SM+Tempol.

11.3.3. Efecto del DPI, NAC y Tempol sobre CMLV tratadas con AP+LEP

En la figura 11 observamos que al tratar las CMLV con 100 μM de AP y 20 ng de LEP e incubar con DPI, NAC y Tempol ninguno de los tres compuestos tiene efecto sobre la generación de ERO, tanto en células control como de SM, ambos tipos celulares mantienen su intensidad de fluorescencia sin cambios. No hay diferencias significativas en la disminución de ERO.

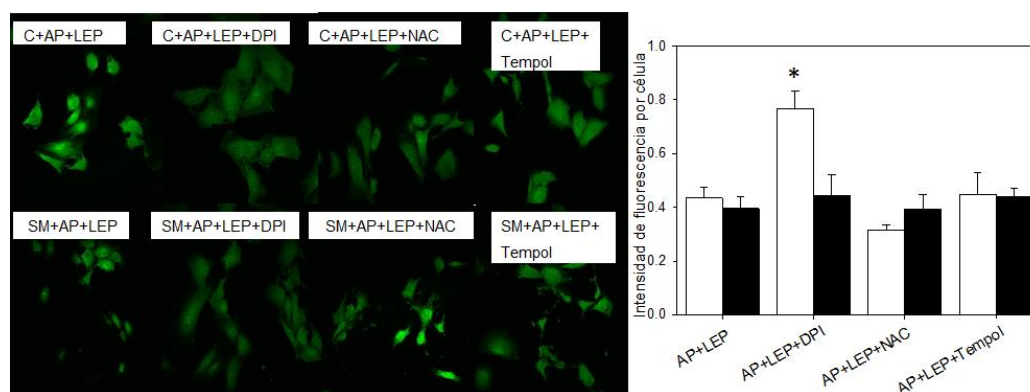


Figura 11. Efecto del DPI, NAC y TEMPOL sobre la generación de ERO inducida por AP y LEP. Las CMLV de ratas C (barras blancas) y SM (barras negras) están tratadas con 5 μM DCF, con 100 μM de AP y 20 ng de LEP e incubadas con diferentes compuestos con actividad antioxidante (DPI, NAC, Tempol). Las imágenes fueron observadas en el microscopio confocal equipado con un objetivo 40X. Los valores corresponden al promedio \pm ES de la intensidad de fluorescencia 14 células ($n=3$ diferentes experimentos de 3 animales diferentes). * $p<0.05$ C vs C+DPI.

11.4. Enzimas antioxidantes

El análisis por Western blot de los niveles de enzimas antioxidantes como la catalasa, la Cu/Zn SOD y la Mn SOD involucradas en la degradación de H_2O_2 y en la dismutación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 respectivamente, se realizó utilizando sus anticuerpos correspondientes.

La figura 12 muestra que no existen diferencias significativas en el contenido de la enzima catalasa entre las CMLV controles y de SM después de los tratamientos con LEP, AP y la combinación de AP más LEP.

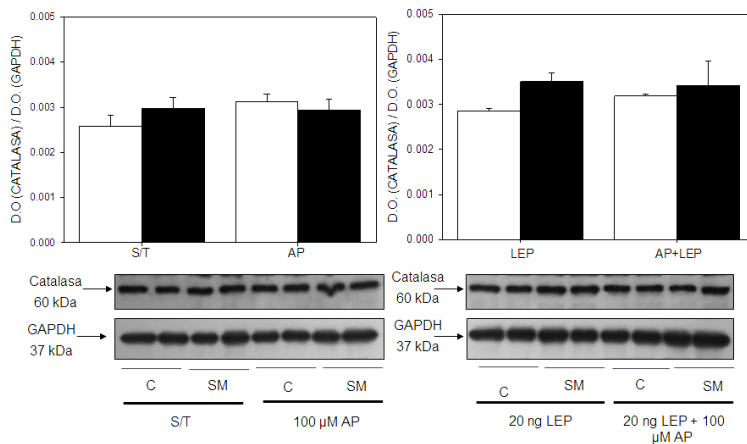


Figura 12. Análisis del contenido de proteína de la enzima catalasa peso molecular de 60 kD en CMLV C (barras blancas) y SM (barras negras). Las CMLV están tratadas con 100 μ M AP, 20 ng LEP y una combinación de 100 μ M AP y 20 ng LEP. Se utilizó como control de carga GAPDH con un peso molecular de 37 kD. Los valores del histograma corresponden al promedio \pm ES de la D.O. Catalasa/ D.O.GAPDH (n=4 diferentes experimentos).

Al evaluar la actividad de esta enzima por medio de la tinción de geles PAGE tal como lo muestra la figura 13, se puede observar que hay un aumento aproximadamente del 40% en la actividad de la catalasa en las células de SM con respecto a los controles independientemente de los diferentes tratamientos, esta diferencia que se observo es estadísticamente significativa.

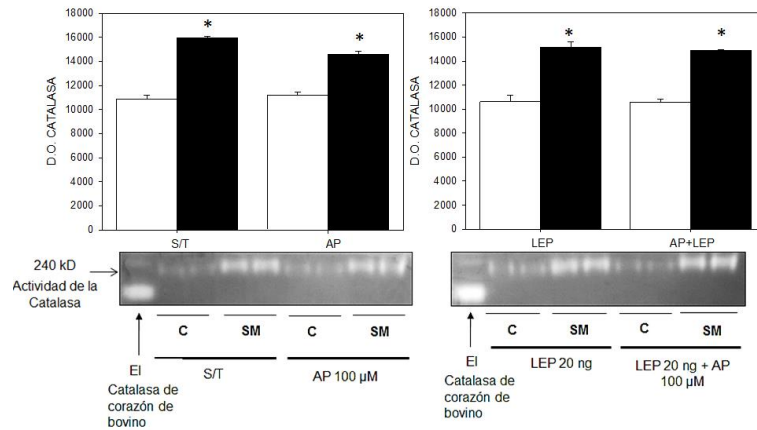


Figura 13. Actividad enzimática de catalasa. El gel teñido con $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{K}_3\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_6)$ en presencia de H_2O_2 permite visualizar la actividad de catalasa. Las bandas blancas corresponden a una eliminación del H_2O_2 por la actividad de la catalasa. Las CMLV C (barras blancas) y SM (barras negras) fueron tratadas con $100 \mu\text{M}$ AP, 20 ng LEP y una combinación de $100 \mu\text{M}$ AP y 20 ng LEP. S/T corresponde a las CMLV sin tratamiento. Los valores del histograma corresponden al promedio \pm ES de la D.O. Catalasa ($n=6$ diferentes experimentos).

El análisis por Western blot de la enzima Cu/Zn SOD con un peso molecular de 23 kD y localizada en el citosol mostró que el contenido de proteína en las muestras sin tratamiento de CMLV SM es mayor que en el control, pero al realizar el análisis estadístico estas diferencias no alcanzan significancia (figura 14). Además, los tratamientos con AP, LEP o la combinación producen una ligera disminución de la Cu/Zn SOD en el SM sin embargo, no es significativa.

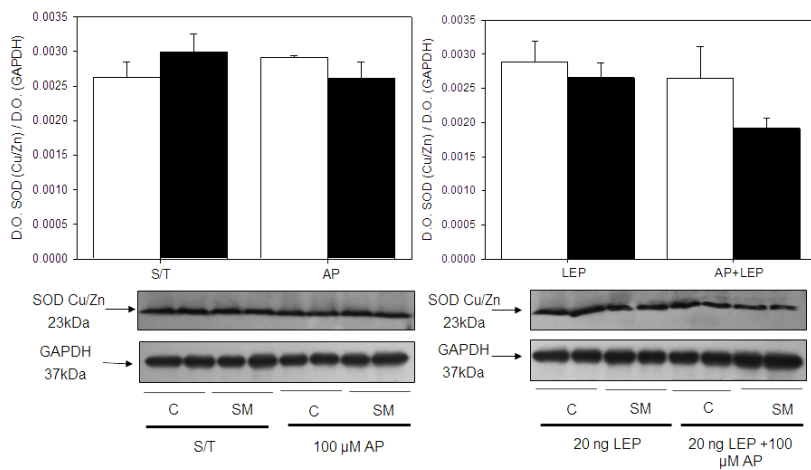


Figura 14. Análisis de la enzima Cu/Zn SOD (23 kD). El blot corresponde a las CMLV C y SM tratadas con 100 μ M AP, 20 ng LEP y una combinación de 100 μ M AP y 20 ng LEP. Se utilizó como control de carga GAPDH de peso molecular de 37 kD. Las CMLV C (barras blancas) y SM (barras negras). Los valores del histograma corresponden al promedio \pm ES de la D.O. SOD (Cu/Zn)/D.O. GAPDH (n=6 diferentes experimentos).

Al evaluar la actividad de la Cu/Zn SOD, se observa que la actividad de esta enzima aumenta aproximadamente un 50% con respecto a las CMLV sin tratamiento al aplicarles AP y LEP sin embargo, el análisis estadístico muestra que este aumento en la actividad de la Cu/Zn SOD no es significativo para las CMLV tratadas con AP pero si para las células del modelo de SM tratadas con LEP (figura 15).

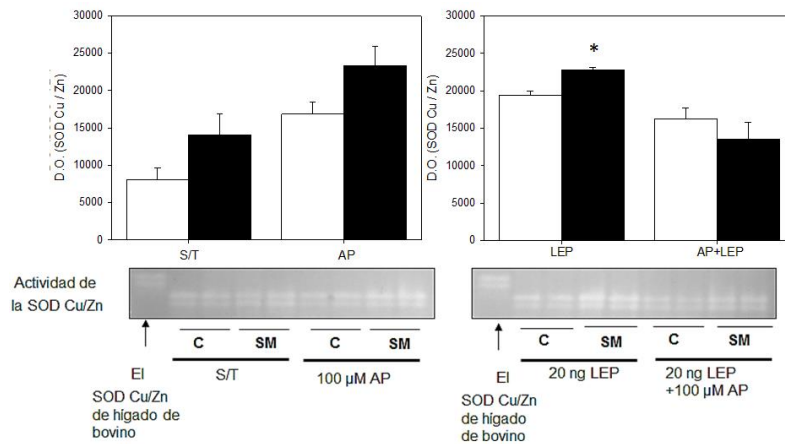


Figura 15. Actividad enzimática de la Cu/Zn SOD. Las bandas blancas corresponden a la actividad de la SOD que por efecto de su reacción con el azul de tetrazolio. Las células C (barras blancas) y SM (barras negras) fueron tratadas con 100 μ M AP, 20 ng LEP y una combinación de 100 μ M AP y 20 ng LEP. Los valores del histograma corresponden al promedio \pm ES de la D.O. SOD Cu/Zn (n=6 diferentes experimentos). *p<0.05 SM vs C.

También se evaluó el contenido de la enzima Mn SOD, la cual se encuentra en la mitocondria y tiene un peso molecular de 25 kD, se observó que la cantidad de proteína está aumentada en el SM y que aumenta más con el tratamiento de AP, LEP y AP+LEP sin embargo, al hacer el análisis estadístico no se encontró diferencia significativa en la cantidad de proteína (figura 16).

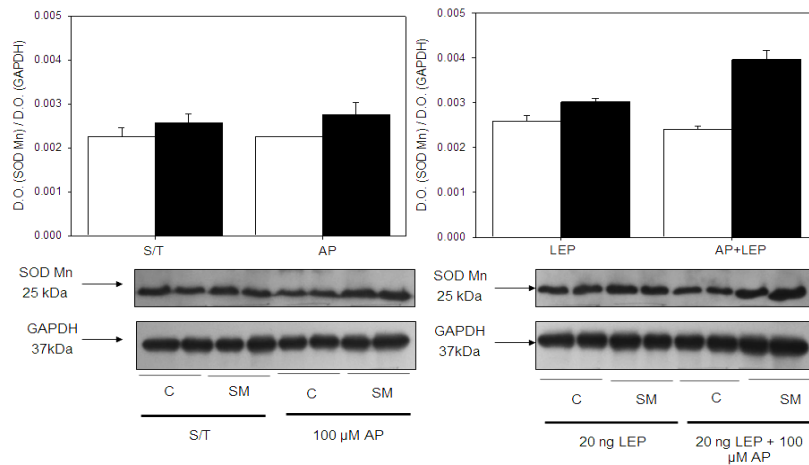


Figura 16. Contenido de Mn SOD (25 kDa). El blot corresponde a las células C y SM fueron tratadas con 100 μ M AP, 20 ng LEP y una combinación de 100 μ M AP y 20 ng LEP. Se utilizó como control de carga GAPDH (37 kDa). Los valores corresponden al promedio \pm ES de la D.O. SOD Mn/D.O. GAPDH de una (n=6 diferentes experimentos). Las barras blancas corresponden a las células C y las barras negras corresponden a las SM.

Al evaluar la actividad de esta enzima se observó que correlaciona con la cantidad de proteína y que se incrementa la actividad en las CMLV controles y SM tratadas con AP y LEP, sin embargo al realizar el análisis estadístico no hay diferencia significativa (figura 17).

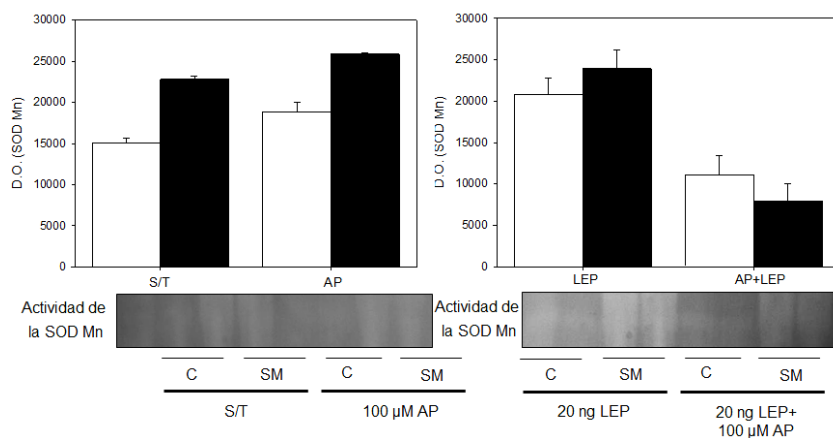


Figura 17. Actividad de la enzima Mn SOD. La imagen es de muestras de células C (barras blancas) y SM (barras negras) tratadas con 100 μM AP, 20 ng LEP y una combinación de 100 μM AP y 20 ng LEP. Los valores corresponden al promedio ± ES de la D.O. SOD Mn de una (n=4 diferentes experimentos).

11.5. Análisis de la Nox

11.5.1. Análisis de la subunidad p22 de la Nox

La Nox es un complejo multiproteico, conformado por distintas subunidades siendo la p22 una de las más importantes ya que es la subunidad que genera el $O_2^{\bullet-}$ por lo tanto un aumento en el nivel de esta proteína se ve reflejado en el aumento de las ERO y consecuente su participación en la generación del estrés oxidante.

El análisis por Western blot de la p22 mostro que no hay diferencia significativa en la cantidad de proteína entre las CMLV C y SM (figura 18). Tampoco el tratamiento de las CMLV con AP, LEP y la combinación afecta el contenido de la subunidad p22.

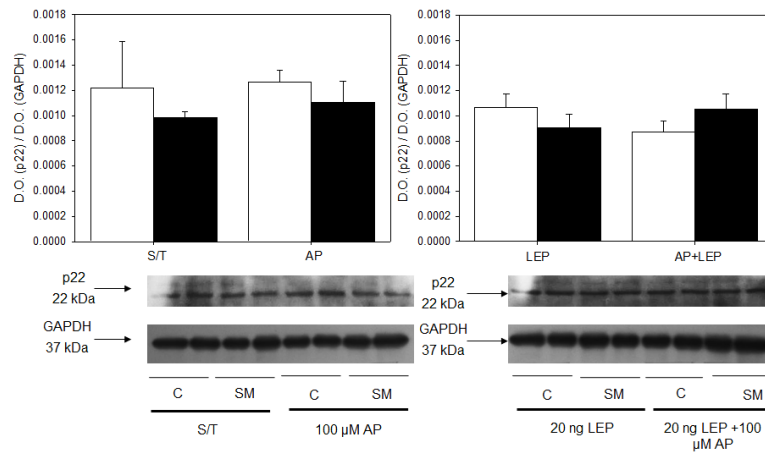


Figura 18. Análisis del contenido de la subunidad p22 (22 kD) del complejo multiproteico Nox. El blot representativo corresponde a las células C y SM tratadas con 100 μM AP, 20 ng LEP y una combinación de 100 μM AP y 20 ng LEP. Se utilizó como control de carga GAPDH. Los valores del histograma corresponden al promedio ± ES de la D.O. p22/D.O. GAPDH (n=4 diferentes experimentos). Las células C corresponden a las barras blancas y las de SM corresponden a las barras negras.

11.5.2. Análisis de la subunidad p47 de la Nox

Además de analizar la subunidad p22 de la Nox también se evaluó la subunidad p47, la cual es necesaria para iniciar la translocación de los factores citosólicos de la Nox hacia la membrana y que se ensamble el complejo.

De acuerdo con el Western blot se observa que la expresión de esta proteína disminuye al tratar las células con AP y la combinación de AP más LEP, ya que las muestras de CMLV tratadas con LEP aparentemente tienen la misma cantidad de

proteína que las células sin tratamiento en ambos tipos celulares sin embargo, estas diferencias no son significativas (figura 19).

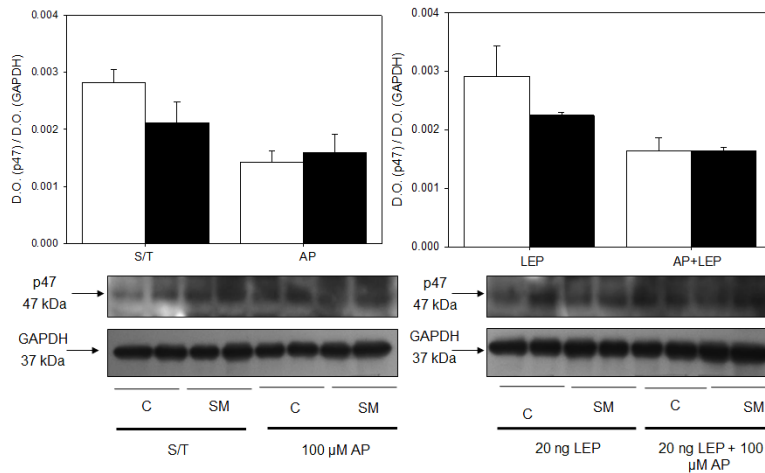


Figura 19. Análisis del contenido de la subunidad p47 de 47 kD del complejo multiproteico Nox. El blot representativo corresponde a las CMLV C y SM tratadas con 100 μM AP, 20 ng LEP y una combinación de 100 μM AP y 20 ng LEP. Se utilizó como control de carga GAPDH (37 kD). Los valores corresponden al promedio ± ES de la D.O. SOD Mn/D.O. GAPDH (n=4 diferentes experimentos). Las CMLV C (barras blancas) y SM (barras negras).

11.6. Proteínas de la vía de señalización de la insulina

La insulina es una hormona encargada de regular procesos primordiales en la célula, como la captación de glucosa o la proliferación celular. La vía de la insulina puede afectarse por diferentes factores, en este caso se analizó el efecto del AP y la LEP, factores que se ven incrementados en el SM.

Las proteínas analizadas fueron IRβ, IRS y Akt total. Con respecto a IRβ se observó que la incubación con la LEP y la combinación de AP más LEP aumentan la cantidad

de proteína, esto en CMLV de animales con SM, sin embargo la diferencia no es estadísticamente significativa (figura 20).

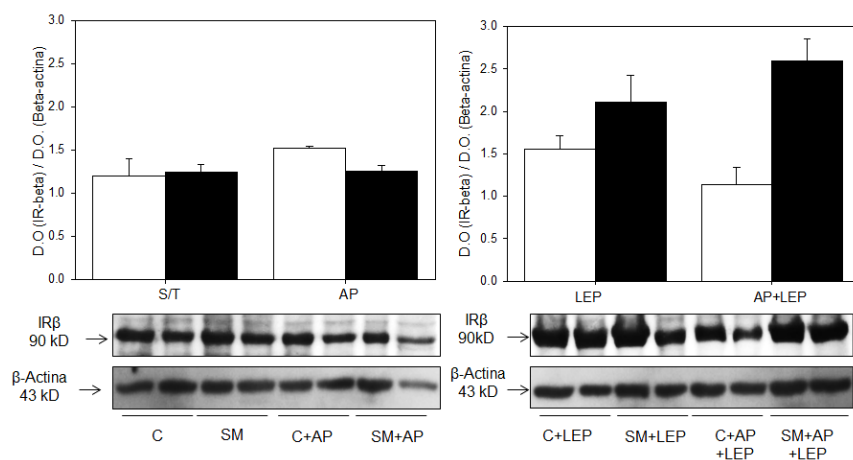


Figura 20. Western blot de la subunidad β del IR (90 kD) en CMLV C y SM después de un tratamiento con 100 μ M AP, 20 ng LEP y una combinación de 100 μ M AP y 20 ng LEP durante 24 hrs. Se utilizó como control de carga β -actina con un peso molecular de 43 kD. Los valores corresponden al promedio \pm ES de la D.O. IR β /D.O. β -actina (n=4 diferentes experimentos). Las barras blancas corresponden a las CMLV C y las barras negras corresponden a las SM.

Después de evaluar IR β , se analizó la cantidad de IRS1, la segunda proteína en la vía de señalización de la insulina, se observó que en condiciones basales y al aplicar el tratamiento con AP hay una mayor cantidad de IRS1 y que al tratar las células con la LEP y la combinación de AP más LEP se incrementa el IRS1 en el SM, a pesar de esto la diferencia no es significativa (figura 21).

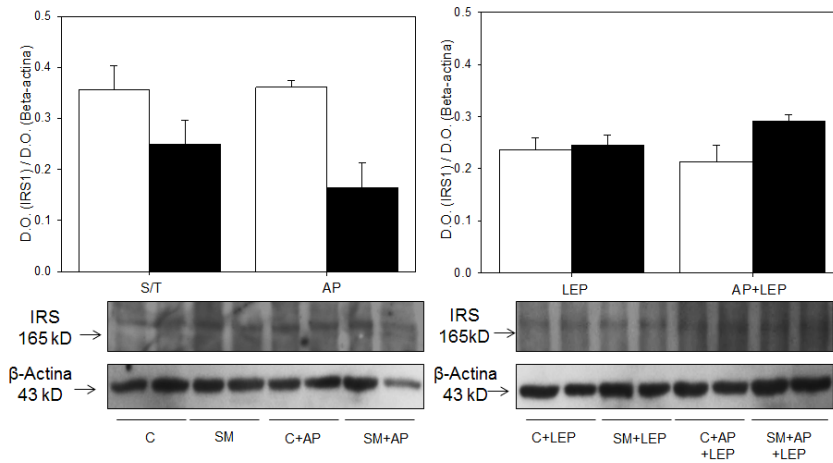


Figura 21. Western blot de IRS1 (165 kD) en CMLV C y SM después de un tratamiento con 100 μ M AP, 20 ng LEP y una combinación de 100 μ M AP y 20 ng LEP durante 24 hrs. Se utilizó como control de carga β -actina (43 kD). Los valores corresponden al promedio \pm ES de la D.O. IRS1/D.O. β -actina (n=4 diferentes experimentos). Las barras blancas corresponden a las CMLV C y la barras negras corresponden a las CMLV de SM.

Finalmente se evaluó la expresión de Akt una de las últimas proteínas en activarse cuando la insulina se une a su receptor, se observó que no existen diferencias en la cantidad de proteína en células controles y SM sin tratamiento y con AP, pero si en las células tratadas con la LEP y la combinación de AP más LEP donde se observa un aumento de esta proteína (figura 22). Los cambios observados no alcanzan significancia.

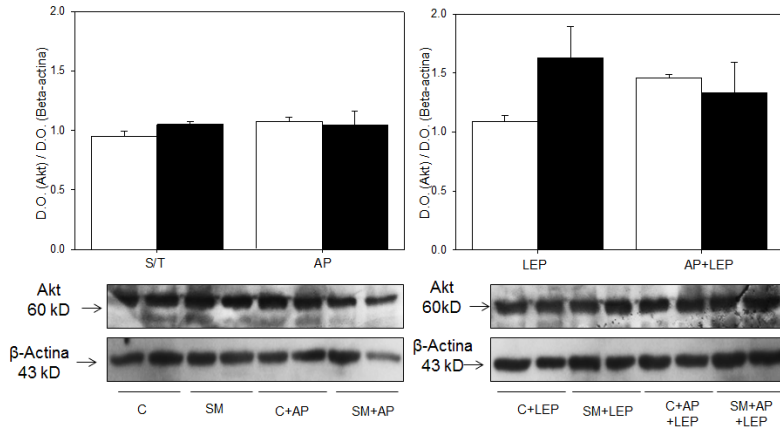


Figura 22. Western blot de Akt total (60 kD) en CMLV C y SM después de un tratamiento con 100 μ M AP, 20 ng LEP y una combinación de 100 μ M AP y 20 ng LEP durante 24 hrs, se utilizó como control de carga β -actina (43 kD). Los valores corresponden al promedio \pm ES de la D.O. IRS1/D.O. β -actina (n=4 diferentes experimentos). Las barras blancas corresponden a las CMLV C y las barras negras corresponden a las de SM.

12. Discusión

El SM es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Además se caracteriza por un aumento en el estrés oxidante debido al incremento de diferentes factores circulantes que interactúan directamente con la pared vascular formada por CMLV y otros tipos de células. Las CMLV cambian de fenotipo contráctil a sintético en respuesta a varios estímulos tales como la generación de ERO inducida por la hipertensión como daño a la pared vascular de las arterias⁸⁹.

El modelo desarrollado en nuestro laboratorio⁸² resulta muy útil para investigar los posibles cambios que una dieta hipercalórica puede inducir en las CMLV aisladas de la aorta de estos animales en comparación con las de animales controles.

12.1. Características generales de los animales

El modelo animal con dieta alta en sacarosa al 30% en el agua de bebida ha sido considerado como un buen modelo de SM ya que desarrolla por lo menos cuatro alteraciones metabólicas características del diagnóstico de SM en la clínica como la hiperlipidemia, obesidad intra-abdominal, RI e HTA^{90, 91}. En nuestro modelo de SM, el aumento de los TG refleja una alta actividad lipogénica en el hígado⁷. El mecanismo por el cual se acumulan los TG en el tejido adiposo está bien descrito en la literatura. Varios estudios han demostrado que una dieta alta en sacarosa induce obesidad abdominal en los roedores, así como se encontró en nuestro modelo, donde la administración de sacarosa indujo cambios significativos en el metabolismo de lípidos que se reflejan en la acumulación de grasa en la cavidad intra-abdominal²³. La acumulación de TG en el tejido adiposo es debida principalmente al metabolismo de

la glucosa y de la fructosa que generan gliceraldehído-3-fosfato, el glicerol y la acetil-CoA que son precursores directo de ácidos grasos, diacil-glicerol y que por medio de la esterificación forman TG que a su vez son hidrolizados por la lipoproteína lipasa para formar AGL, los cuales se almacenan en TG en el tejido adiposo.

Por otro lado, el aumento en la concentración de los AGL en el plasma puede explicarse por una mayor actividad lipolítica del tejido adiposo debido a la RI. En los procesos de la lipólisis, la lipasa hormono-sensible (LHS), es la enzima limitante en la liberación de los AGL a partir del tejido adiposo. Esta enzima se activa por fosforilación que es sensible a la insulina⁹².

En condiciones fisiológicas, las altas concentraciones de la insulina secretada en respuesta a concentraciones elevadas de glucosa en la sangre disminuyen las cantidades de AMPc en el tejido adiposo. Esta situación conduce a la defosforilación de la LHS y por lo tanto, su inactivación, inhibiendo la liberación de los ácidos grasos para la oxidación. En el caso de RI, la LHS es insensible a la inhibición por la insulina y por consecuencia se observa un aumento en la concentración de los AGL circulantes⁹³.

Los AGL como el palmítico o el oleico han sido descritos como inductores de estrés oxidante en diferentes tejidos por medio de estimulación de la generación de ERO intracelular⁷. En nuestro modelo de SM se observó un aumento en el AP y ácido oleico como AGL en el plasma de los animales con SM⁹⁴.

12.2. Generación de ERO en CMLV

Las CMLV son componentes importantes de la pared vascular que interactúan continuamente con diferentes moléculas circulantes. Por lo tanto un aumento en la fluorescencia del DCF que resulta de su oxidación por las ERO, en las CMLV aisladas del modelo con SM puede ser debido a un aumento en los sistemas generadoras de ERO o a una disminución de la defensa antioxidante. Sin embargo, el análisis por western blot no muestra diferencia en las subunidades p22 y p47 de la NOX y tampoco muestra una disminución de la catalasa o la SOD. Por otro lado la incubación de las CMLV controles con AP como AGL, induce un aumento significativo en la fluorescencia del DCF por mayor generación de ERO. Este aumento de ERO en CMLV es inhibido por el DPI que es un inhibidor de las flavoproteínas tales como la Nox y por el tempol que mimetiza la actividad de la SOD disminuyendo la generación de ERO en ambos grupos control y SM. Los resultados de la inhibición de la fluorescencia por el DPI y por el tempol sugieren la generación del $O_2^{\bullet-}$ por vía de la Nox o por la mitocondria. El DPI ha sido utilizado ampliamente en la literatura para elucidar la participación de la Nox en diferentes sistemas biológicos aunque puede también inhibir varias flavoproteínas mitocondriales y enzimas dependientes de NAD(P)H tales como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogena y lactato deshidrogenasa. Sin embargo, estas últimas no generan ERO por lo tanto se considera que el DPI inhibe la generación del $O_2^{\bullet-}$ generado exclusivamente por la Nox en el sistema vascular⁹⁵.

Por otro lado los experimentos muestran que las CMLV controles y SM son más sensibles al tratamiento crónico (24 h) por el AP que al tratamiento agudo (15 min) lo

que sugiere que se requiere un periodo largo para el metabolismo del AP probablemente a nivel mitocondrial para la generación de ERO. En nuestro trabajo no hemos podido meter en evidencia la participación directa de la mitocondria en la generación de ERO en las CMLV de los animales con SM. Sin embargo la incubación de las células con el AP sugiere que la mitocondria puede participar en la generación de ERO por su actividad catabólica de los ácidos grasos que se encuentren en exceso por el SM. En cuanto al efecto de la LEP sobre la generación de las ERO, los resultados muestran que ambos tipos de CMLV son más sensibles al tratamiento agudo (15 min) que al tratamiento crónico (24 h). Estos resultados indican que la diferencia en la sensibilidad de las CMLV entre el AP y la LEP puede ser debido a que esta última actúa a través de su receptor. Sin embargo, diferentes vías han sido sugeridas como mediadores de los efectos de los AGL tales como el palmitato e incluyen un aumento en la producción de ceramidas⁹⁶, la acumulación de diacilglicerol, que conduce a activación de la PKC θ ⁹⁷, la disfunción mitocondrial, el aumento de estrés oxidante⁹⁸, la activación del factor nuclear proinflamatorio NF-kappa B y quinasas activadas por mitógenos^{99, 100}.

En cuanto al mecanismo por el cual la LEP ejerce su efecto sobre la generación de ERO no está de todo establecido, sin embargo el efecto del DPI o del tempol sobre la liberación de ERO en ambas células sugiere la participación de la Nox en la generación del O^{*}. Por otro lado las CMLV expresan la isoforma Ob-Rb del receptor de LEP, capaz de activar una amplia variedad de vías de señalización intracelular y la mediación de muchas acciones biológicas pertinentes. En particular, los procesos

implicados en la aterogénesis, tales como la migración, proliferación e hipertrofia de las CMLV que están mediadas por una cascada de señalización intracelular que implica moléculas como JAK/STAT, PI3K/Akt, ERK1/2, MAPK p38, mTOR, y RhoA/ROCK. Algunas de estas acciones de LEP son particularmente evidentes; otros están mediadas por la Nox que induce un aumento en las ERO¹⁰¹.

Aunque el aumento en la generación de ERO en las CMLV de SM también puede ser atribuido a una disminución en la actividad de algunas enzimas antioxidantes tales como catalasa y SOD. El análisis por Western blot de la catalasa, Mn SOD y la Cu/Zn SOD no muestra cambios significativos en los niveles de estas enzimas entre controles y SM. Sin embargo, la actividad determinada por tinción específica en geles nativos, muestra un aumento de la actividad de catalasa independientemente del tratamiento, Cu/Zn y Mn SOD en las CMLV de SM que puede ser considerado como respuesta a la alta generación de ERO en las CMLV del modelo de SM para protegerlas del daño por estrés oxidante en nuestras condiciones experimentales. De la misma manera el tratamiento de las células con AP más LEP induce un aumento en el contenido de las enzimas.

La combinación de AP más LEP induce un aumento significativo de la generación de ERO en el grupo de células control pero no en el SM con los diferentes tiempos de tratamiento probablemente esto se deba a que las células del grupo control al tratarlas con AP mostraron ser más sensibles produciendo más ERO y al efecto de la LEP, debido a que se ha reportado que esta hormona puede favorecer el metabolismo de los ácidos grasos contribuyendo a la generación de ERO directamente o a través de la mitocondria por β -oxidación¹⁰².

Los efectos de las ERO sobre la función vascular depende críticamente de la cantidad producida. Cuando se forman en pequeñas cantidades, H_2O_2 puede actuar como un segundo mensajero modulando la actividad de cinasas y fosfatasas en varias vías de señalización regulando la proliferación celular, la diferenciación y migración¹⁰³. Sin embargo, a altas concentraciones, las ERO pueden causar modificación oxidativa de lípidos, proteínas y ADN dando como resultado toxicidad e incluso apoptosis y necrosis. Por lo tanto el aumento en la actividad de la catalasa, Cu/Zn SOD- y Mn SOD en las CMLV SM y con tratamiento con AP o LEP puede considerarse como un sistema de protección contra la diferenciación y la proliferación de las CMLV de SM. En la literatura no existen datos que explican el posible mecanismo por el cual la LEP o el AP inducen un aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes mencionadas en nuestro trabajo. Sin embargo existen evidencias experimentales que relacionan el aumento en la generación de ERO y el cambio del estatus redox intracelular con la activación de factores transcripcionales tales como el Nrf2 y el NFκB sensibles a cambios en el estado redox y responsables de la expresión de las enzimas antioxidantes tales como la Mn SOD¹⁰⁴. En nuestro trabajo, el SM induce un aumento en el contenido de esta proteína, al igual que en la actividad en las CMLV sugiriendo la participación de la mitocondria en la generación de ERO en el SM.

12.3. Proteínas de la vía de la insulina

El estrés oxidante se ha sugerido como un factor que participa en el desarrollo y progresión de la RI, se ha reportado que el H_2O_2 inhibe la fosforilación del IR y

reduce la activación de PI3K¹⁰⁵, por lo tanto el estrés oxidante induce un deterioro de la transducción de señales de la insulina. La reducción en la expresión de las proteínas de la vía de la insulina se debe a que el estrés oxidante inhibe la actividad de mTOR que conduce a una reducción de toda la síntesis de proteínas¹⁰⁶, por lo que en este trabajo se consideró analizar las proteínas involucradas en la vía de señalización de insulina como IR β , donde no se observan diferencias significativas entre las CMLV aisladas de los animales con SM en comparación con los controles. En cuanto al aumento en la expresión del IR β inducido por la LEP en las CMLV con SM puede considerarse como compensación contra la hiperinsulinemia y la RI inducida por los factores secretados por la acumulación de la grasa intra-abdominal del modelo de SM.

Con respecto a la expresión del IRS-1 y Akt, no hay diferencia en la expresión de estas proteínas entre las CMLV controles y SM, sin embargo no se descarta el efecto que pueda tener la generación incrementada de ERO en las CMLV aisladas de la aorta con SM sobre la señalización de la insulina, que implica no solamente el contenido de estas proteínas sino también su activación por fosforilación. En este trabajo la fosforilación de estas proteínas no fue evaluada sin embargo varios trabajos en la literatura han descrito el papel que juegan las ERO en la fosforilación de las proteínas de la vía de insulina en diferentes sistemas celulares cuyo transporte de glucosa depende de la insulina tales como el músculo esquelético, el tejido adiposo y el hígado¹⁰⁷. Existen pocos trabajos que han mostrado la RI en las CMLV y como se asocia con el cambio de fenotipo contráctil a sintético. Por otro lado

la sobre-expresión de IR β en las CMLV incubadas con LEP puede ser una respuesta para que la insulina contribuya al mantenimiento del fenotipo contráctil de las CMLV en el SM. En efecto la insulina ha sido descrita como un factor importante en el mantenimiento del carácter contráctil de las CMLV por una vía dependiente de PI3K¹⁰⁸. En un modelo de ratones transgénicos *Insr(+/-) Irs1(+/-) Apoe(-/-)* con deficiencia de IR β y IRS-1, alteraciones en la señalización de la insulina induce mayor proliferación de las CMLV acelerando la aterosclerosis en el modelo¹⁰⁹. A pesar de que no encontramos diferencias significativas en IR β se observa un aumento en las células del grupo de SM, que como se menciona anteriormente se ha reportado que es un mecanismo compensatorio para mantener el fenotipo contráctil de las CMLV, el cual se puede ver afectado por la generación de ERO que se induce debido al AP y a la LEP.

13. Conclusiones

- El modelo de SM inducido por una dieta alta en sacarosa en el agua de bebida desarrolla todos los parámetros necesarios para el diagnóstico del SM al nivel clínico aumento de los TG, AGL, LEP y grasa intra-abdominal
- Las CMLV en cultivo primario aisladas de la aorta del modelo de SM generan mayor cantidad de ERO que las CMLV controles.
- Estos resultados permiten intentar elucidar el mecanismo por el cual el SM es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares que implican la proliferación y la migración de las CMLV desde la media hacia la íntima.

14. Perspectivas

Elucidar porque mecanismo las ERO generadas en el modelo de SM inducen la proliferación y el cambio de fenotipo contráctil a fenotipo sintético de las CMLV nos permitirá un acercamiento a la creación de alternativas terapéuticas que tengan como blanco alguna de las moléculas implicadas en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (AGL, LEP e insulina).

Para activar la vía de señalización de la insulina las CMLV fueron estimuladas con insulina, sin embargo se ha descrito que son menos sensibles a esta hormona y más sensibles al factor de crecimiento homólogo de insulina (IGF-1/2). Por esta razón se considera evaluar la fosforilación de las proteínas de la vía de la insulina después de estimular las CMLV con IGF-1/2.

15. Referencias

¹ Oda E. Metabolic syndrome: its history, mechanisms, and limitations. *Acta Diabetol*; 2012; 49:89–95.

² Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr*. 2004; 92(3):347-55.

³ Adler V, Yin Z, et al. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene*. 1999; 18(45):6104-11.

⁴ Valko M, Leibfritz D, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39: 44-89.

⁵ Manea A. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species: involvement in vascular physiology and pathology. *Cell Tissue Res*. 2010; 342(3):325-39

⁶ Chiong M, Cartes-Saavedra B, et al. Mitochondrial metabolism and the control of vascular smooth muscle cell proliferation. *Front Cell Dev Biol*. 2014; 15; 2: 72.

⁷ Ruiz A, Chávez MM, et al. High-sucrose diet increases ROS generation, FFA accumulation, UCP2 level, and proton leak in liver mitochondria. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001; 301(6): E1198-207.

⁸ Alberti, K. G., P. Zimmet, et al. The metabolic syndrome a new worldwide definition. *Lancet*. 2005; 366(9491): 1059-62.

⁹ Lioudaki E, Vrentzos GE, et al. Prevalence of metabolic syndrome according to different definitions in a hypertensive population. *Angiology*. 2012; 63(1):39-47.

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

¹⁰ Alberti, KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998; 15(7): 539-53.

¹¹ Grundy SM, Cleeman JI, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation.* 2005; 112(17): 2735-52.

¹² Levesque J, Lamarche B. The Metabolic Syndrome: Definitions, Prevalence and Management. *J Nutrigenet Nutrigenomics.* 2008; 1: 100–108.

¹³ Son SM. Role of vascular reactive oxygen species in development of vascular abnormalities in diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007; 77 (1): S65-S70.

¹⁴ Toh BH, Bobik A, et al. Immune mechanisms in vascular disease and stroke. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 1-2.

¹⁵ Ray PD, Huang BW, et al. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 2012; 24(5):981-90.

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

¹⁶ Valko M, Leibfritz D, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39: 44-89.

¹⁷ Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care.* 2008; 31: S170-80.

¹⁸ Martin SS, Qasim A, et al. Leptin Resistance: A Possible Interface of Inflammation and Metabolism in Obesity-Related Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 52(15): 1201-1210.

¹⁹ Grygiel-Górniak B, Puszczewicz M. Oxidative Damage and Antioxidative Therapy in Systemic Sclerosis. *Mediators of Inflammation*. 2014; Vol. 2014, 11 pag.

²⁰ Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch*. 2010; 459(6): 923-939.

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

²¹ Irshad M, Chaudhuri PS. Oxidant-antioxidant system: role and significance in human body. *Indian J Exp Biol*. 2002; 40(11):1233-9.

²² Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arteriosclerosis thromb Vasc Biol*. 2004; 24(5):816-23.

²³ Meigs JB, Larson MG, et al. Association of oxidative stress, insulin resistance, and diabetes risk phenotypes: the Framingham offspring study. *Diabetes Care*. 2007; 30(10):2529-35.

²⁴ Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*. 2003; 42(6):1075-81.

²⁵ Furukawa S, Fugita T, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impacts on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2004; 114(12):1752-62.

²⁶ Ruiz-Ramírez A, Ortiz-Balderas E, et al. Glycine restores glutathione and protects against oxidative stress in vascular tissue from sucrose-fed rats. *Clin Sci (Lond)*. 2014; 1; 126(1):19-29.

²⁷ Metz RP, Patterson JL, et al. Vascular smooth muscle cells: isolation, culture, and characterization. *Methods Mol Biol*. 2012; 843: 169-76.

-
- ²⁸ Boyer F, Vidot JB, et al. Oxidative stress and adipocyte biology: focus on the role of AGEs. *Oxid Med Cell Longev*. 2015; 534873.
- ²⁹ Inoguchi T, Li P, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent Activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*. 2000; 49: 1939-1945.
- ³⁰ Kuroda J, Sadoshima J. NADPH Oxidase and Cardiac Failure. *J Cardiovasc Transl Res*. 2010; 3(4): 314–320.
- ³¹ Chinen I, Shimabukuro M, et al. Vascular lipotoxicity: endothelial dysfunction via fatty-acid-induced reactive oxygen species overproduction in obese Zucker diabetic fatty rats. *Endocrinology*. 2006; 148(1): 160-165.
- ³² Schleicher E, Friess U. Oxidative stress, AGE, and atherosclerosis. *Kidney International*. 2007; 72:S17–S26.
- ³³ Evans JL, Maddux BA, et al. The molecular basis for oxidative stress- induced insulin resistances. *Antioxid Redox Signal*. 2005; 7: 1040-1052.
- ³⁴ Van Gaal LF, Mertens IL, et al. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*. 2006; 444: 875.
- ³⁵ Bertelsen M, Ånggard EE, et al. Oxidative stress impairs insulin internalization in endothelial cells in vitro. *Diabetologia*. 2001; 44: 605-13.
- ³⁶ Yudkin JS, Stehouwer CD, et al. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19(6): 972-978.

³⁷ Huang F, Xion X, *et al.* Leptin-induced vascular smooth muscle cell proliferation via regulating cell cycle, activating ERK1/2 and NF-kB. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2010; 42(5): 325-331.

³⁸ Rahmouni K, Haynes WG. Leptin and the Cardiovascular System. *Recent Prog Horm Res.* 2004; 59: 225-244.

³⁹ Procopio C, Andreozzi F, *et al.* Leptin-Stimulated Endothelial Nitric-Oxide Synthase via an Adenosine 5 -Monophosphate-Activated Protein Kinase/Akt Signaling Pathway Is Attenuated by Interaction with C-Reactive Protein. *Endocrinology.* 2009; 150 (8): 3584- 3593.

⁴⁰ Rodríguez A, Gómez J, *et al.* Leptin Inhibits the Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells Induced by Angiotensin II through Nitric Oxide Dependent Mechanisms. *Mediators Inflamm.* 2010; 1-10.

⁴¹ Bjorbaek C, Uotani S, *et al.* Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem.* 1997; 272(9): 32686–32695.

⁴² Kellerer M, Koch M, *et al.* Leptin activated PI-3 kinase in C2C12 myotubes via janus kinase-2 (JAK-2) and insulin receptor substrate-2 (IRS-2) dependent pathways. *Diabetologia* 1997; 40(4): 1358–1362.

⁴³ Ren J. Leptin and hyperleptinemia—from friend to foe for cardiovascular function. *J Endocrinol.* 2004; 181(10): 1-10.

⁴⁴ Rodríguez A, Gómez J, *et al.* Leptin Inhibits the Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells Induced by Angiotensin II through Nitric Oxide Dependent Mechanisms. *Mediators Inflamm.* 2010; 1-10.

⁴⁵ Clempus RE, Griendling KK. Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 2006; 71(2): 216-25

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

⁴⁶ Rabêlo LA, Nunes de Souza V, et al. Redox Unbalance: NADPH Oxidase as Therapeutic Target in Blood Pressure Control. *Arq Bras Cardiol.* 2010; 94(5): 643-651

⁴⁷ Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003; 552 (2): 335-344.

⁴⁸ Adam-Vizi V, Chinopoulos Ch. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci.* 2006; 27 (12): 639-645.

⁴⁹ Brookes PS. Mitochondrial H⁺ Leak and ROS Generation: An odd couple. *Free Radic Biol Med.* 2005; 38: 12-23.

⁵⁰ Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, et al. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2009; 47(4): 333-43.

⁵¹ Churchman AT, Siow RC. Isolation, culture and characterization of vascular smooth muscle cells. *Methods Mol Biol.* 2009; 467: 127-38.

⁵² Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 1995; 75: 487-517.

⁵³ Owens GK, Kumar MS, et al. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 2004; 84: 767-801.

⁵⁴ Marx SO, Marks AR. Bench to bedside: the development of rapamycin and its application to stent restenosis. *Circulation* 2001; 104: 852-5.

⁵⁵ Shah PK, Falk E, et al. Human monocyte-derived macrophages induce collagen break down in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-

degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation* 1995; 92: 1565-9.

⁵⁶ Ranganath M. Cardiovascular actions of insulin. *Endocr Rev.* 1997; 28(5): 463–491.)

⁵⁷ Gündüz D, Thom J, et al. Insulin stabilizes microvascular endothelial barrier function via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-mediated Rac1 activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30(6): 1237-45.

⁵⁸ Chisalita SI, Johansson GS, et al. Human aortic smooth muscle cells are insulin resistant at the receptor level but sensitive to IGF1 and IGF2. *J Mol Endocrinol.* 2009; 43: 231–239

⁵⁹ Gonzalez-Navarro H, Vila-Caballer M, et al. Plasma insulin levels predict the development of atherosclerosis when IRS2 deficiency is combined with severe hypercholesterolemia in apolipoprotein E-null mice. *Front Biosci.* 2007; 12: 2291–2298.

⁶⁰ Baumgartl J, Baudler S, et al. Myeloid lineage cell-restricted insulin resistance protects apolipoprotein E-deficient mice against atherosclerosis. *Cell Metab.* 2006; 3: 247–256

⁶¹ Taniyama Y, Hitomi H, et al. Mechanisms of reactive oxygen species-dependent downregulation of insulin receptor substrate-1 by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 1142–1147.

⁶² Hitomi H, Mehta PK, et al. Vascular smooth muscle insulin resistance, but not hypertrophic signaling, is independent of angiotensin II-induced IRS-1 phosphorylation by JNK. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011; 301: C1415–C1422.

⁶³ Tanti JF, Jager J. Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Curr Opin Pharmacol.* 2009; 9(6): 753-762.

⁶⁴ Boura-Halfon S, Zick Y. Phosphorylation of IRS Proteins, Insulin Action and Insulin Resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009. 296(4): E581-91.

⁶⁵ Christe M, Hirzel E, et al. Obesity affects mitochondrial citrate synthase in human omental adipose tissue. *ISRN Obes.* 2013; 826027

⁶⁶ Hastie R, Lappas M. The effect of pre-existing maternal obesity and diabetes on placental mitochondrial content and electron transport chain activity. *Placenta.* 2014; 9: 673-83.

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

⁶⁷ Martins AR, Nachbar RT, et al. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids Health Dis.* 2012; 11: 30.

⁶⁸ Galadari S, Rahman A, et al. Role of ceramide in diabetes mellitus: evidence and mechanisms. *Lipids Health Dis.* 2013; 12: 98.

⁶⁹ Baños G, EL Hafidi M. et al. Insulin Resistance and the Metabolic Syndrome. In: Insuline Resistance New Research. *Nova Science Publisher.* 2009: 49-97.

⁷⁰ Reaven G. Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. *Annu Rev Med.* 1993; 44: 121-31.

⁷¹ Suhail M. Na⁺, K⁺ ATPase: Ubiquitous Multifunctional Transmembrane Protein and its Relevance to Various Pathophysiological Conditions. *J Clin Med Res.* 2010; 2(1): 1-17.

⁷² Dhalla NS, Rangi S, et al. Alterations in sarcoplasmic reticulum and mitochondrial functions in diabetic cardiomyopathy. *Exp Clin Cardiol.* 2012; 17(3): 115-120.

⁷³ Trebak M, Ginnan R, et al. Interplay Between Calcium and Reactive Oxygen/Nitrogen Species: An Essential Paradigm for Vascular Smooth Muscle Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2010; 12 (5): 657-674.

⁷⁴ Draznin B, Sussman K, et al. Possible role of cytosolic free calcium concentrations in mediating insulin resistance of obesity and hyperinsulinemia. *J Clin Invest.* 1998; 82(4): 1848-1852.

⁷⁵ Byyny RL, Lo Verde M, et al. Cytosolic calcium and insulin resistance in elderly patients with essential hypertension. *Am J Hypertens.* 1992; 5(5): 459-464.

⁷⁶ Beer NA, Jakubowicks D, et al. Effects of nitrendipine on glucose tolerance and serum insulin and dehydroepiandrosterone sulfate levels in insulin-resistant obese and hypertensive men. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993; 76(5): 178-183.

⁷⁷ Zemel, MB. Calcium modulation of hypertension and obesity: mechanisms and implications. *J Am Coll Nutr.* 2001; 20(7): 428S-435S.

⁷⁸ Hsueh WA, Law RE. Insulin signaling in the arterial wall. *Am J Cardiol.* 1999 84(1A): 21J-24J.

⁷⁹ Pérez I, El Hafidi M, *et al.* Effect of sugar-induced hypertension in rats on the pattern of serum araquidonic, dihomo- γ -linoleic and linoleic acids. *Medical Science Research*. 1999; 27: 847-849

⁸⁰ Reaven GM, Ho H. Sugar induced hypertension in Sprague-Dawley rats. *Am J Hypertens*. 1992; 4: 610-614.

⁸¹ Carvajal K, El Hafidi M, *et al.* Myocardial damage due to ischemia and reperfusion in hypertriglyceridemic and hypertensive rats: participation of free radicals and calcium overload. *J Hypertens*. 1999; 17: 1607-1616.

⁸² El Hafidi M. Perez I, *et al.* Glycine intake decreases plasma free fatty acids, adipose cell size, and blood pressure in sucrose-fed rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004; 287(6): R1387-93.

⁸³ El Hafidi M, Valdez R, *et al.* Possible relation between altered fatty acid composition of serum, platelets, and aorta and hypertension induced by sugar feeding in rats. *Clin and Exper Hypertension*. 2000; 22(1): 99-108.

⁸⁴ El Hafidi M, Cuéllas A, *et al.* Effect of sucrose addition to drinking water that induces hypertension in the rats on liver microsomal Δ -9 and Δ -5 desaturase activities. *J Nutr Biochem*. 2001; 12: 396-403.

⁸⁵ Folch L, Lee M, *et al.* A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957; 226(1): 497-509

⁸⁶ Nägele U, Hägele EO, *et al.* Reagent for the enzymatic determination of serum total triglycerides with improved lipolytic efficiency. *J. Clin. Biochem*. 1984; 22: 165–174

Código de campo cambiado

⁸⁷ Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-54.

⁸⁸ Riganti C, Gazzano E, et al. Diphenyleneiodonium inhibits the cell redox metabolism and induces oxidative stress. *J Biol Chem.* 2004; 279: 47726-31.

⁸⁹ Salabei J K, Hill B G. Autophagic regulation of smooth muscle cell biology. *Redox Biology.* 2015; 4: 97–103

⁹⁰ Risser TR, Chen YD, et al. Characterization of a model of dietary-induced hypertriglyceridemia in young, nonobese rats. *Journal of Lipid Research.* 1979; 20: 371-378.

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

⁹¹ Hulman S, Falkner B. The Effect of Excess Dietary Sucrose on Growth, Blood Pressure, and Metabolism in Developing Sprague-Dawley Rats. *Pediatric Research.* 1994; 36: 95-101.

⁹² Soria A, D'Alessandro ME, et al. Duration of feeding on a sucrose-rich diet determines metabolic and morphological changes in rat adipocytes. *J Appl Physiol.* 2001; 91(5): 2109-16.

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

⁹³ Holm C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31(Pt 6): 1120-4.

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

⁹⁴ El Hafidi M, Baños G. In Vivo Plasma Lipid Oxidation in Sugar-Induced Rat Hypertriglyceridemia and Hypertension. *Hypertension.* 1997; 30(3 Pt 2): 624-8

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

⁹⁵ Riganti C, Gazzano E, et al. Diphenyleneiodonium inhibits the cell redox metabolism and induces oxidative stress. *J Biol Chem.* 2004; 279: 47726-31.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

⁹⁶ Gao H, Feng XJ, et al. Downregulation of adipose triglyceride lipase promotes cardiomyocyte hypertrophy by triggering the accumulation of ceramides. *Arch Biochem Biophys*. 2015; 565: 76-88.

⁹⁷ Tsuchiya Y, Hatakeyama H, et al. Palmitate-induced Down-regulation of Sortilin and Impaired GLUT4 Trafficking in C2C12 Myotubes. *J Biol Chem*. 2010; 285(45): 34371-81.

Código de campo cambiado

⁹⁸ Gremmels H, Bevers LM, et al. Oleic acid increases mitochondrial reactive oxygen species production and decreased endothelial nitric oxide synthase activity in cultured endothelial cells. *Eur J Pharmacology*. 2015; 751: 67-72.

Código de campo cambiado

⁹⁹ Coll T, Eyre E, et al. Oleate reverses palmitate-induced insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells. *J Biol Chem*. 2008; 283(17): 11107-16

¹⁰⁰ Rudijanto A. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Med Indones*. 2007; 39(2): 86-93

¹⁰¹ Trovati M, Doronzo G, et al. Leptin and vascular smooth muscle cells. *Curr Pharm Des*. 2014; 20(4): 625-34.

¹⁰² Wasan KM, Looije NA, et al. Emerging pharmacological approaches to the treatment of obesity. *J Pharm Pharm Sci*. 2005; 8(2): 259-71.

¹⁰³ Griendling KK, Fitz Gerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation*. 2003; 108: 1912–1916.

¹⁰⁴ Gorbunov NV, Garrison BR, et al. Adaptive redox response of mesenchymal stromal cells to stimulation with lipopolysaccharide inflammagen: mechanisms of remodeling of tissue barriers in sepsis. *Oxid Med Cell Longev*. 2013; 186795.

¹⁰⁵ Kimura K, Katsumata Y, et al. Effect of Paraquat-Induced Oxidat Stress on Insulin Regulation of Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-1 Gene Expression. *J Clin Biochem Nutr*. 2010; 46(2):157-67.

¹⁰⁶ Patel S, Van Der Kaay J, et al. Insulin regulation of hepatic insulin like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) gene expression and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling is impaired by the presence of hydrogen peroxide. *Biochem J*. 2002; 365: 537-45.

¹⁰⁷ Cersosimo E, De Fronzo R A. Insulin resistance and endothelial dysfunction: the road map to cardiovascular diseases. *Diabetes Metab Res Rev*. 2006; 22: 423–436.

¹⁰⁸ Low Wang C C, Gurevich I, et al. Insulin Affects Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype and Migration Via Distinct Signaling Pathways. *Diabetes* 52: 2562–2569, 2003.

¹⁰⁹ Galkina EV, Butcher M, et al. Accelerated atherosclerosis in Apoe^{-/-} mice heterozygous for the insulin receptor and the insulin receptor substrate-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012; 32(2): 247-56.